

# Zweiphotonen-Spektroskopie an Wildtyp-Pflanzen und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Claudia Quentmeier  
aus Kassel

1. Referent:	Professor Dr. Peter Jomo Walla
2. Referent:	Professor Dr. Karl-Heinz Gericke
eingereicht am:	11.08.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	11.12.2008

Druckjahr 2009

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Stefan Bode, Claudia C. Quentmeier, Pen-Nan Liao, Tiago Barros, Peter J. Walla, Xanthophyll-cycle dependence of the energy transfer between carotenoid dark states and chlorophylls in NPQ mutants of living plants and in LHC II, Chemical Physics Letters 450: 379–385, (2008)

## **Tagungsbeiträge**

Quentmeier, C., Bode, S., Wehling, A., Walla, P.J., Two-Photon Excitation Studies on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. New insights by measuring NPQ-mutants and dark light adaptation. (Poster) 14<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis, Glasgow (2007)

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	1
2 Theoretische Grundlagen .....	3
2.1 Photosynthese.....	3
2.2 Ablauf der Lichtreaktion .....	4
2.2.1 Photosystem II.....	6
2.2.2 Cytochrom <i>bf</i> .....	7
2.2.3 Photosystem I.....	7
2.2.4 Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase.....	7
2.2.5 ATP-Synthase.....	8
2.3 Ablauf der Dunkelreaktion.....	9
2.4 Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe.....	11
2.4.1 Photosystem I.....	11
2.4.2 Photosystem II.....	14
2.4.3 Lichtsammelkomplexe .....	16
2.5 Pigmente und Proteine der Lichtsammelkomplexe.....	19
2.5.1 Chlorophylle.....	19
2.5.2 Carotinoide .....	22
2.5.3 PsbS.....	28
2.6 Quenching Prozesse .....	30
2.7 Energietransfermechanismen .....	32
3 Materialien und Methoden .....	35
3.1 Pflanzen.....	35
3.2 Mutanten.....	35
3.3 Pulse-Amplitude-Modulation.....	36
3.4 Das Lasersystem.....	41
3.4.1 Vitesse Duo .....	42
3.4.2 RegA 9000.....	44
3.4.3 OPA 9400.....	46
3.4.4 Aufbau der Fluoreszenzmessungen.....	48



4 Ergebnisse .....	51
4.1 Durchführung der Messung.....	51
4.2 Wildtyp-Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
4.3 Xanthophyll-Zyklus Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	57
4.4 Mutanten von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit verändertem Gehalt an PsbS .....	62
4.5 Absolute Fluoreszenzintensitäten der Messungen nach Ein- oder Zweiphotonenanregung .....	65
5 Diskussion .....	67
5.1 Modelle zur Erklärung von nicht photochemischem Quenching.....	67
5.2 Diskussion der Messergebnisse.....	88
5.2.1 Diskussion der Transfereffizienz im dunkeladaptierten Zustand.....	88
5.2.2 Diskussion der Transfereffizienz im helladaptierten Zustand.....	92
6 Zusammenfassung und Ausblick .....	99
7 Literatur.....	102
8 Abkürzungsverzeichnis .....	110
9 Abbildungsverzeichnis .....	112
10 Anhang .....	116
11 Danksagung.....	134

## 1 Einleitung

Als Photosynthese wird die Erzeugung von organischen Stoffen aus anorganischen Verbindungen unter Verwendung von Lichtenergie in Lebewesen bezeichnet. Sowohl Pflanzen und Algen, als auch einige Bakterien beziehen ihre Lebensgrundlage aus der Photosynthese. Die von der Sonne abgestrahlte Lichtenergie wird von Pigmenten absorbiert und durch die Photosynthese in speicherbare chemische Energie umgewandelt. Diese chemische Umwandlung und Speicherung findet seit ca. vier Milliarden Jahren auf der Erde statt.

Insbesondere die oxygene Photosynthese, bei der die Fixierung des anorganischen Kohlenstoffdioxids durch Reduktion zu organischen Verbindung das zentrale Element darstellt, ist einer der bedeutendsten enzymatischen Prozesse überhaupt. Sowohl die CO<sub>2</sub>-Fixierung als auch die Bildung von Sauerstoff sind essenziell für den weitaus größten Teil des Lebens auf der Erde. Ohne die oxygene Photosynthese könnten aerobe Organismen nicht leben, da nur durch diesen Prozess Sauerstoff und organische Verbindungen gebildet werden. Selbst ein Großteil der anaeroben Organismen hat sich auf die Verwertung dieser organischen Materialien spezialisiert.

Pro Jahr erfolgt bei der derzeitigen Sonneneinstrahlung eine Produktion von ca. 10<sup>11</sup> Tonnen organischer Trockenmasse durch Photosynthese. Außerdem sind alle fossilen Rohstoffe, wie Erdöl, Braun- und Steinkohle Folgeprodukte der Photosynthese. Des Weiteren wird in der Stratosphäre aus dem gebildeten molekularen Sauerstoff Ozon gebildet, welches einen Großteil der schädlichen UV-Strahlung der Sonne absorbiert. Generell bewirkt die Vegetation durch Beschattung und Verdunstung ein gemäßigtes Klima. So ist das Licht der Sonne die Grundlage für photosynthetische Reaktionen und damit die Photosynthese zentrales Element für das Leben auf der Erde.

Da die Sonneneinstrahlung auf Pflanzen während eines Tages und über das Jahr starken Schwankungen unterliegt, haben sich neben den eigentlichen Prozess des Lichtsammelns auch Regulationsmechanismen ausgebildet, um die Pflanze vor der Beschädigung durch überschüssige Energie zu schützen. Die Prozesse der Lichtabsorption und der anschließende Energietransfer in Pflanzen laufen auf Piko- oder sogar Femtosekundenzeitskalen ab. Daher muss auch der Energietransfer der Regulationsmechanismen auf ähnlich schnellen Zeitskalen

## 1 Einleitung

ablaufen, um einen effektiven Schutz zu ermöglichen. Sowohl für die Lichtabsorption als auch für diese Schutzreaktionen sind die Wechselwirkungen der Pflanzenpigmente, Chlorophylle und Carotinoide, von entscheidender Bedeutung. Diese Pigmente interagieren in unterschiedlicher Weise miteinander. So steuern sie, ob die absorbierte Energie zu den Reaktionszentren der Photosysteme geleitet wird, oder ob, bei zu starker Lichteinstrahlung, die überschüssige Energie als Wärme aus der Pflanze abgeführt wird. Dieses Abführen der Energie wird als nicht-photochemisches Quenchen (npq) bezeichnet. Durch Untersuchungen der energetischen Wechselwirkungen zwischen den photosynthetisch aktiven Pigmenten können Rückschlüsse auf die Energietransferprozesse gezogen werden. Dabei wird dem  $S_1$ -Zustand der Carotinoide aufgrund seiner energetischen Lage eine zentrale Rolle zugesprochen.

Problematisch für die Untersuchung dieses Zustandes ist, dass eine Einphotonenanregung aufgrund von Auswahlregeln verboten ist und deshalb einfache spektroskopische Untersuchungen nicht möglich sind. Eine Zweiphotonenanregung der Carotinoide ist jedoch möglich, da hierfür inverse Auswahlregeln gelten. Das für die Energietransferreaktionen wichtige Energieniveau kann selektiv angeregt und untersucht werden.

Durch kombinierte Einphotonenanregung der Chlorophylle und Zweiphotonenanregung der Carotinoide mit jeweiliger Detektion der Chlorophyllfluoreszenz können die Wechselwirkungen der in der Pflanze vorliegenden Pigmente sowohl im helladaptierten Zustand als auch im dunkeladaptierten Zustand untersucht werden. So können Rückschlüsse auf die Energietransferwege in Pflanzen bei unterschiedlichen Lichtbedingungen gewonnen werden. Dazu wird ein Fluoreszenzaufbau aus konfokaler Zweiphotonenanregung mit dem etablierten Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometer kombiniert. Damit werden *in vivo* Messungen an Blättern des Wildtyps der biologischen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und an charakterisierten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Diese Mutanten besitzen Veränderungen in der Carotinoidbiosynthese oder bei der Ausbildung von Photosystemuntereinheiten. Die daraus gewonnen Ergebnisse werden mit Resultaten des Wildtyps verglichen und in Zusammenhang mit postulierten Modellen zur Abfuhr der überschüssigen Energie aus den Pflanzen gebracht. Dabei zeigt sich, dass das nicht-photochemische Quenchen in einem konzertierten Mechanismus aus zwei verschiedenen Prozessen unter der Beteiligung von PsbS und Zeaxanthin oder Lutein ablaufen könnte.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Photosynthese<sup>1-5</sup>

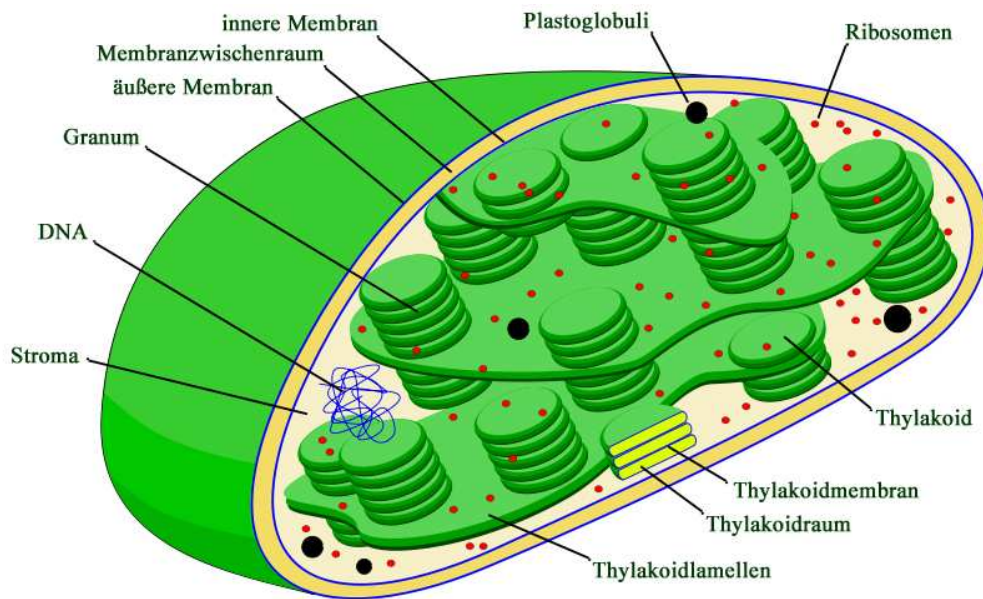
Die Nutzung von Licht als Energiequelle durch Organismen wird Phototrophie genannt. Ist außerdem die einzige Kohlenstoffquelle dieser Lebewesen  $\text{CO}_2$ , werden sie als photoautotroph bezeichnet. Dies trifft für viele Organismen wie Pflanzen, Algen oder auch Cyanobakterien zu, die Lichtsammelpigmente nutzen, um mit Hilfe der absorbierten elektromagnetischen Strahlung Kohlenstoffdioxid zu binden und zu organischen Verbindung zu reduzieren. Photosynthese als Umwandlung von Strahlungsenergie in chemische Energie ist einer der wichtigsten biologischen Prozesse der Erde. Die Photosynthese lässt sich auf folgende Reaktion reduzieren:



Dabei wird Kohlenstoffdioxid durch eine Serie von Redoxreaktionen in organische Verbindungen in Form von Zuckern umgewandelt. Die Elektronen für die Reduktionen werden durch Spaltung von Wasser bereitgestellt, wobei Protonen und Sauerstoff gebildet werden. Die für diesen Prozess benötigte Energie wird von den Organismen durch lichtabsorbierende Pigmente aufgenommen.

In dieser Arbeit wird die pflanzliche Photosynthese untersucht. In höheren Pflanzen findet die Photosynthese in speziellen intrazellulären Organellen, den Chloroplasten (Abbildung 2 - 1) statt. Diese Chloroplasten haben sich aus frei lebenden Bakterien, die in eine nicht photosynthetisch aktiven Zelle eingedrungen sind, entwickelt und besitzen immer noch eine eigene ringförmige DNA und eine eigene Proteinbiosynthese. Trotzdem ist auch ein Teil der in der Thylakoidmembran enthaltenen Proteine in DNA, die im Zellkern enthalten ist, kodiert. Chloroplasten haben einen Durchmesser von ca.  $5\text{ }\mu\text{m}^4$  und besitzen eine innere und äußere Membran, welche für organische Moleküle und Ionen durchlässig ist. Diese Membranen begrenzen den intrazellulären Raum, der auch als Stroma bezeichnet wird. In den Chloroplasten befindet sich ein komplexes Membransystem, die Thylakoide. In der Thylakoidmembran sind die photosynthetisch aktiven Proteine eingebettet. Sie bildet außerdem einen dicht übereinander gestapelten Bereich, der Granum genannt wird.

## 2 Theoretische Grundlagen



**Abbildung 2 - 1: Schematischer Aufbau eines Chloroplasten (von Miguelsierra, Wikipedia, lizenziert unter GNU-Lizenz für freie Dokumentation, Lizenztext siehe Anhang)**

Die Photosynthese kann in zwei wichtige Schritte eingeteilt werden, die Primär- oder Lichtreaktion und die Sekundär- oder Dunkelreaktion. In der Lichtreaktion findet die Aufnahme der Lichtenergie durch die Lichtsammelpigmente, die Weiterleitung der Energie an die Reaktionszentren und die Ladungstrennung statt. Diese Prozesse laufen in der Thylakoidmembran ab. Die Dunkelreaktion erfolgt im Stroma und beinhaltet die Synthese von Zucker aus  $\text{CO}_2$ .

### 2.2 Ablauf der Lichtreaktion<sup>1-6</sup>

An der Lichtreaktion sind verschiedene Proteinkomplexe beteiligt (Abbildung 2 - 2 und Abbildung 2 - 3): die beiden Photosysteme II und I nehmen die Lichtenergie auf und sind durch Cytochrom *bf* miteinander verbunden. Außerdem wird die aufgenommene Lichtenergie durch die ATP-Synthase in chemische Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) umgewandelt. Die  $\text{NADP}^+$ -Reduktase erzeugt das Reduktionsmittel NADPH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat), das in der Dunkelreaktion für die Bildung von Zuckern benötigt wird.

## 2 Theoretische Grundlagen

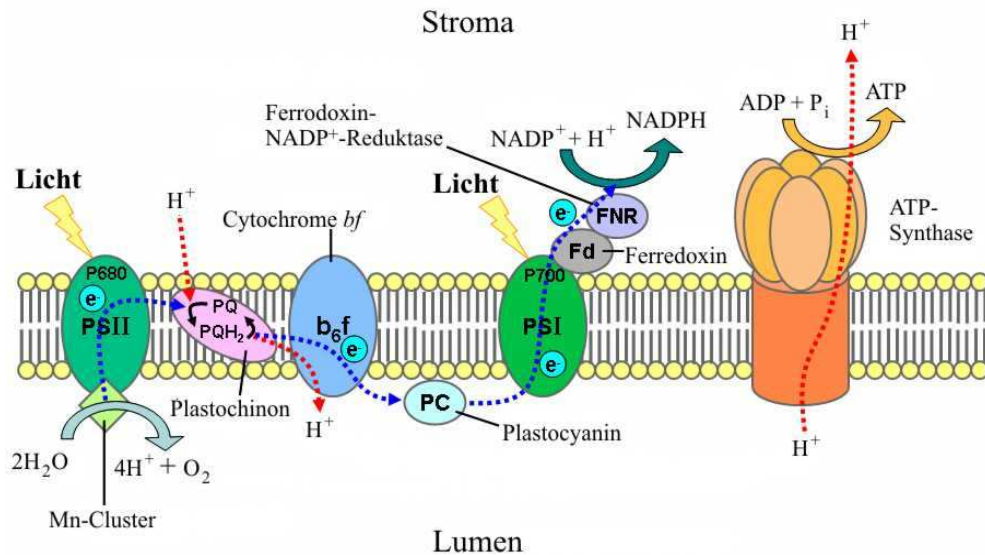


Abbildung 2 - 2: Querschnitt durch die Thylakoidmembran mit den für die Lichtreaktion benötigten Proteine. Dabei symbolisieren blaue Pfeile den Elektronentransport und rote den Protonentransport. (von Tameeria, Wikipedia, lizenziert unter GNU-Lizenz für freie Dokumentation, Lizenztext siehe Anhang)

Die bei der Lichtreaktion ablaufenden Prozesse können in einem Z-Schema zusammengefasst werden.

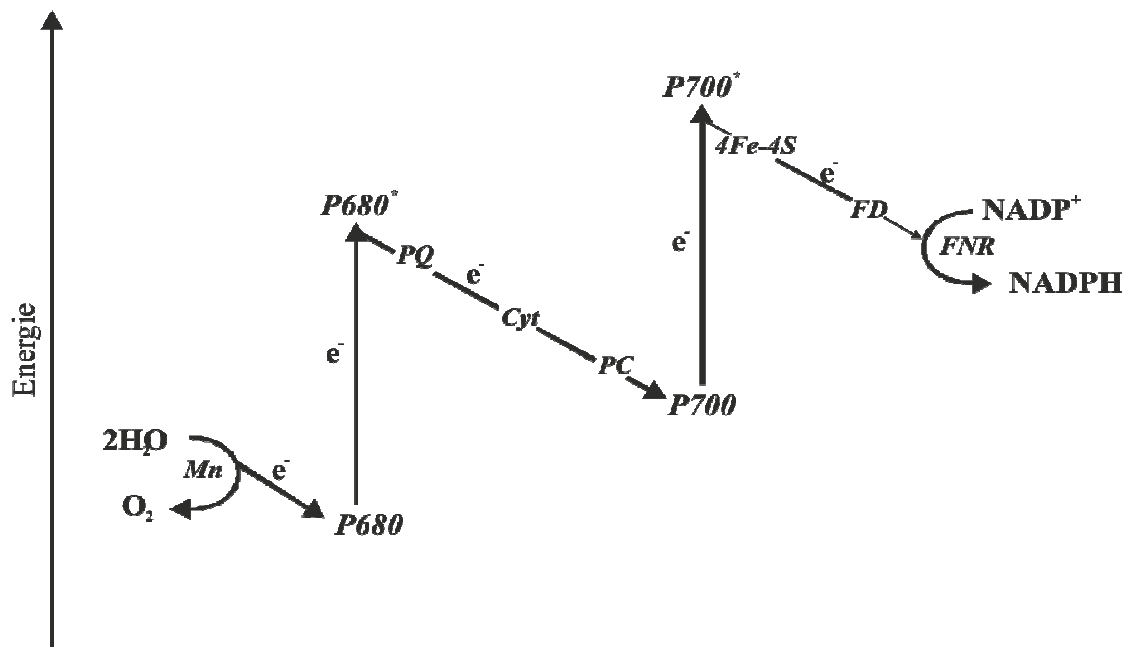


Abbildung 2 - 3: Energieschema der Elektronentransportkette während der Lichtreaktion (nach R. E. Blankenship<sup>1)</sup>)

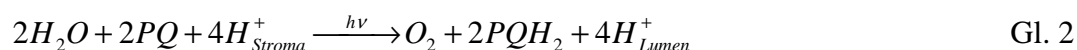
Im Folgenden wird die Funktion der Proteinkomplexe, die bei der Lichtreaktion wichtig sind, erläutert.

### 2.2.1 Photosystem II

Das Photosystem II (PSII) ist das einzige biologische System, das fähig ist,  $H_2O$  zu  $O_2$  zu oxidieren. Im PSII finden zwei Reaktionen statt, die über die Aufnahme von Lichtenergie gesteuert werden: die Oxidation von Wasser und die Reduktion von Plastochinon (PQ). Der Kern des PSII enthält das Reaktionszentrum bestehend aus den zwei Proteinen D1 und D2 an welche zwei dicht benachbarte Chlorophylle gebunden sind, die als *special pair* bzw. wegen ihres Absorptionsmaximums bei 680 nm als P680 bezeichnet werden. Das P680 besitzt wegen excitonischen Wechselwirkungen eine verringerte Anregungsenergie. Die von den Lichtsammelkomplexen aufgenommene Energie wird an das P680 weitergeleitet. Durch diese Anregung wird ein Elektron an ein benachbartes Chlorophyll welches statt des  $Mg^{2+}$ -Ion zwei  $H^+$ -Ionen enthält weitergegeben. Darauf folgt eine Übertragung auf ein gebundenes PQ. Die Übertragung des Elektrons vom Reaktionszentrum zum PQ – Molekül läuft innerhalb von 200 ps ab, um eine mögliche Rekombination zu verhindern. Von diesem fest gebundenen PQ-Molekül wird das Elektron auf ein freies PQ transferiert, welches durch die Übertragung eines zweiten Elektrons auf demselben Weg und Aufnahme von zwei Protonen zu Plastochinol ( $PQH_2$ ) reduziert wird. Die dafür benötigten Protonen stammen aus dem Stroma, wodurch der pH-Wert des Stromas erhöht wird. Das  $PQH_2$  löst sich vom Reaktionszentrum und diffundiert in den hydrophoben Teil der Membran.

$P680^+$  liegt nach der Elektronenübertragung als starkes Oxidationsmittel vor und nimmt Elektronen von Wassermolekülen auf, die an ein Cluster aus vier Mangan-Atomen gebunden sind. Dabei existiert das in dem Cluster enthaltene Mangan in verschiedene Oxidationsstufen und kann in einem sechstufigen Zyklus letztendlich zwei Wasser-Moleküle zu Sauerstoff und vier Protonen oxidieren.

Da PSII sich über die ganze Thylakoidmembran erstreckt, liegt die PQ - Reduktion auf der Stroma-Seite und die Wasser-Oxidation auf der Lumen-Seite. Dadurch werden zwei Protonen für die Reduktion von einem PQ vom Stroma aufgenommen und vier Protonen durch die Oxidation von Wasser in das Lumen freigesetzt, welches zu einem Protonengradienten über die Thylakoidmembran führt. Die ablaufenden Reaktionen im PSII lassen sich wie folgt zusammenfassen:



### 2.2.2 Cytochrom *bf*

Der Enzymkomplex, der als Elektronenüberträger PSII mit dem Photosystem I (PSI) verbindet, wird Cytochrome *bf* genannt und ist ebenfalls in die Thylakoidmembran eingebettet. Die Übertragung der im PQH<sub>2</sub> vorhandenen Elektronen findet für jedes Elektron einzeln auf das Kupferprotein Plastocyanin (PC) statt, wobei Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> reduziert wird. Folgende Reaktionsgleichung verdeutlicht den ablaufenden Prozess, bei dem der schon durch das PSII erzeugte Protonengradient noch weiter verstärkt wird:



### 2.2.3 Photosystem I

Ein weiterer Teil der Lichtreaktion wird durch das PSI katalysiert, in dem grundsätzlich ähnliche Prozesse wie im PSII ablaufen. Das *special pair* von zwei Chlorophyll a Molekülen liegt im Zentrum des PSI vor und absorbiert Licht einer Zentralwellenlänge von 700 nm, weshalb dieses *special pair* auch P700 genannt wird. Nach Absorption von Licht durch Lichtsammelpigmente und folgendem Energietransfer zum Reaktionszentrum wird das angeregte Elektron aus dem P700 über ein Chlorophyll und ein Chinon zu mehreren 4Fe-4S-Clustern geleitet. Danach schließt sich eine Übertragung des Elektrons auf Ferredoxin (FD) an. Das P700<sup>+</sup> wird durch die Elektronenübertragung des in Cytochrom *bf* gebildeten PC neutralisiert. Die Gesamtreaktion des PSI lässt sich als einfache Ein-Elektronen Oxidations-Reduktions-Gleichung zusammenfassen:



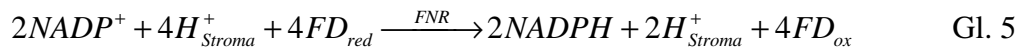
### 2.2.4 Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase

Die in den verschiedenen Schritten der Lichtreaktion aufgenommene Energie ist in dem entstandenen FD<sub>red</sub> gespeichert. Zwei der FD<sub>red</sub> werden mittels des Flavoproteins Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) oxidiert, wobei zwei Elektronen und ein Proton auf Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADP<sup>+</sup>) übertragen werden und so NADPH bilden.



## 2 Theoretische Grundlagen

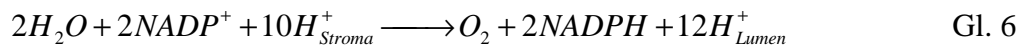
Die an dem Flavoprotein ablaufende Reaktion lässt sich folgendermaßen beschreiben:



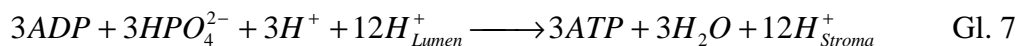
Die für diese Reaktion benötigten Protonen werden wieder von der Stroma-Seite der Thylakoidmembran aufgenommen und erhöhen damit erneut den Protonengradienten. Das in diesem Prozess gebildete NADPH wird ins Stroma abgegeben und kann jetzt als zwei-Elektronen Reduktionsmittel in der Dunkelreaktion genutzt werden.

### 2.2.5 ATP-Synthase

Der in den drei vorangegangenen Prozessen aufgebaute Protonengradient über die Thylakoidmembran wird zur Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) ausgenutzt. Für die Lichtreaktion ergibt sich folgende Teilreaktionsgleichung:

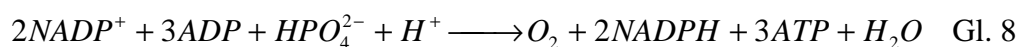


Die ATP-Synthase ist ein Transmembranprotein, in dem eine Protonenpumpe und eine ATPase gekoppelt sind. Im Fall der Lichtreaktion tritt sie als Protonen getriebene ATP-Synthase auf, wobei die ATP-Bildung mit dem energetisch begünstigten Transport von Protonen entlang des Protonengradienten einher geht. Die ATP-Synthase wandelt also letztendlich die von den Photosystemen aufgenommene Lichtenergie in chemische Energie um. Für die Erzeugung eines ATP Moleküls aus Adenosindiphosphat (ADP) reichen 4 Photonen aus:



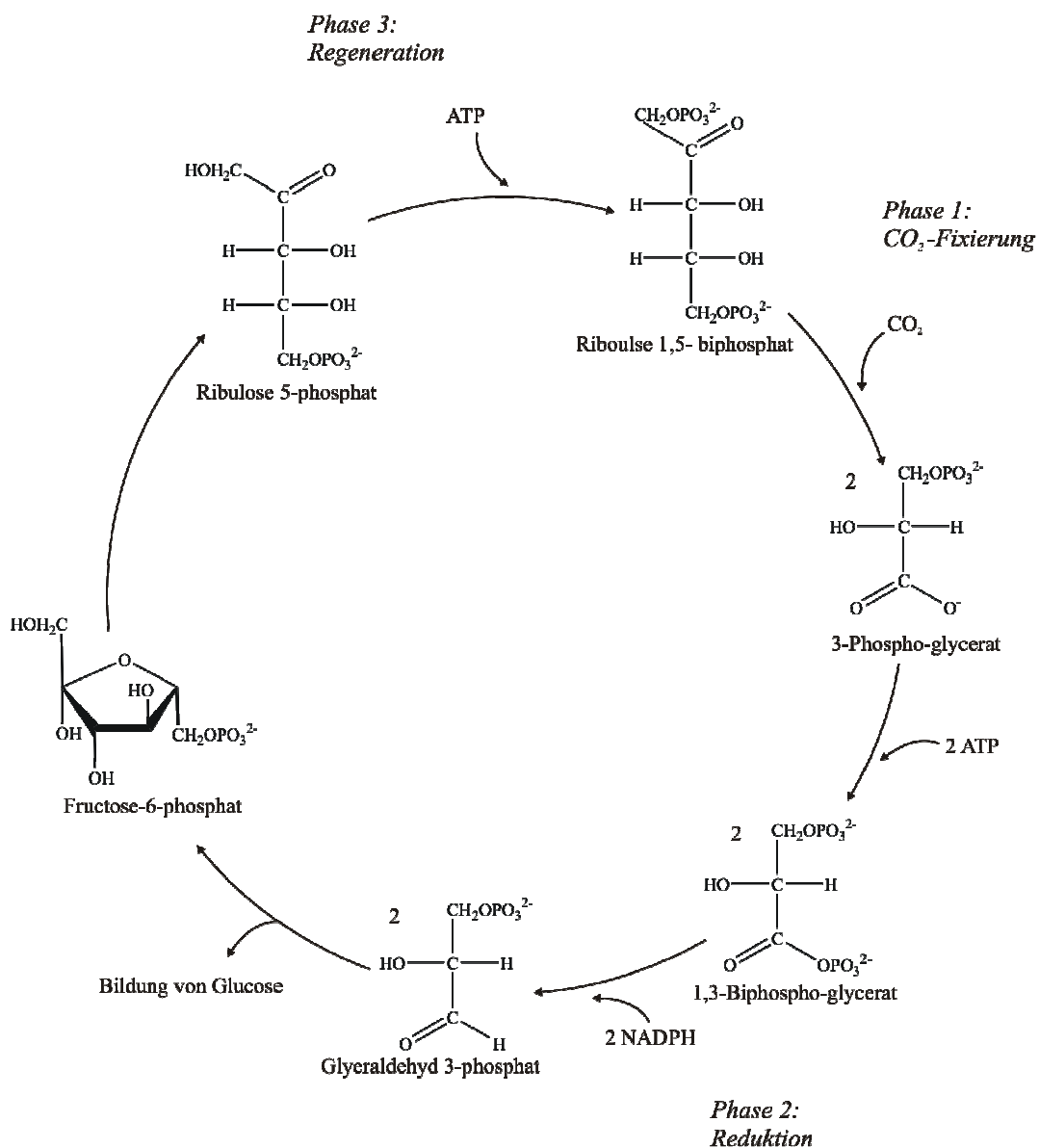
Das in diesem Prozess gebildete ATP wird auch ins Stroma abgegeben und kann sofort als Energielieferant in der Dunkelreaktion genutzt werden.

Für die Lichtreaktion ergibt sich also zusammenfassend die folgende Gesamtreaktionsgleichung:



### 2.3 Ablauf der Dunkelreaktion<sup>1-4</sup>

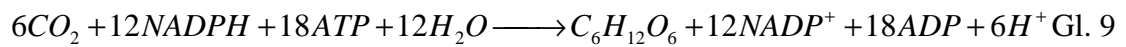
Die Dunkelreaktion ist der zweite wichtige Prozess der Photosynthese. Sie soll in dieser Arbeit nur kurz skizziert werden, um einen vollständigen Überblick in die Photosynthese zu geben. Die Dunkelreaktion findet im Stroma der Chloroplasten statt, dabei reagieren die in der Lichtreaktion gebildeten Stoffe NADPH und ATP mit  $\text{CO}_2$  und Wasser zu Hexosen (Abbildung 2 - 4). Die Reaktion besteht aus mehreren zyklisch angeordneten Teilschritten und wird auch als Calvin-Zyklus bezeichnet.



**Abbildung 2 - 4: Der Calvin-Zyklus besteht aus drei Phasen, wobei die in der Lichtreaktion gebildeten Stoffe umgesetzt werden und Zucker synthetisiert wird. (nach J.M. Berg<sup>3</sup>)**

## 2 Theoretische Grundlagen

Das Zuckermolekül Ribulose-1,5-bisphosphat dient dabei als Akzeptormolekül für  $\text{CO}_2$ . Nach Reaktion der entstandenen Hexose mit Wasser entstehen zwei Triose-Moleküle. Durch Zufuhr von Energie in Form von ATP und Reduktion der Triosen mittels NADPH entsteht letztendlich durch mehrere enzymatische Schritte wieder die Ausgangsverbindung Ribulose-1,5-diphosphat. Erst nach dem sechsfachen Durchlauf des Calvin-Zyklus sind zwei Triose-Moleküle entstanden, die dann zur Synthese von Glucose oder Stärke genutzt werden können. Die Stärkemoleküle werden als Energiespeicher in der Pflanze im Stroma abgelagert. Die Summengleichung für den Calvin-Zyklus lautet:



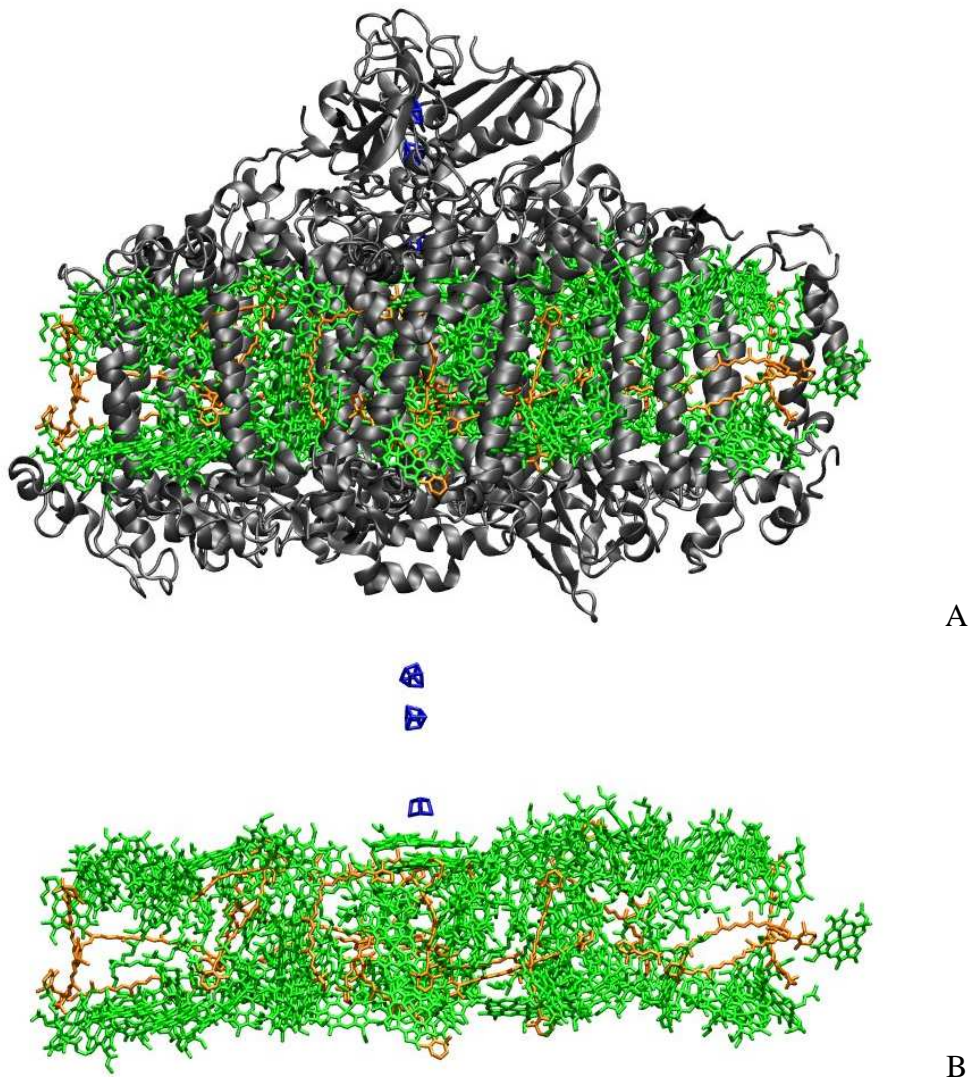
Nach Durchlaufen des Calvin-Zyklus sind der Energiespeicher ADP und das Wasserstoff transportierende Coenzym  $\text{NADP}^+$  wieder für die Lichtreaktion regeneriert.

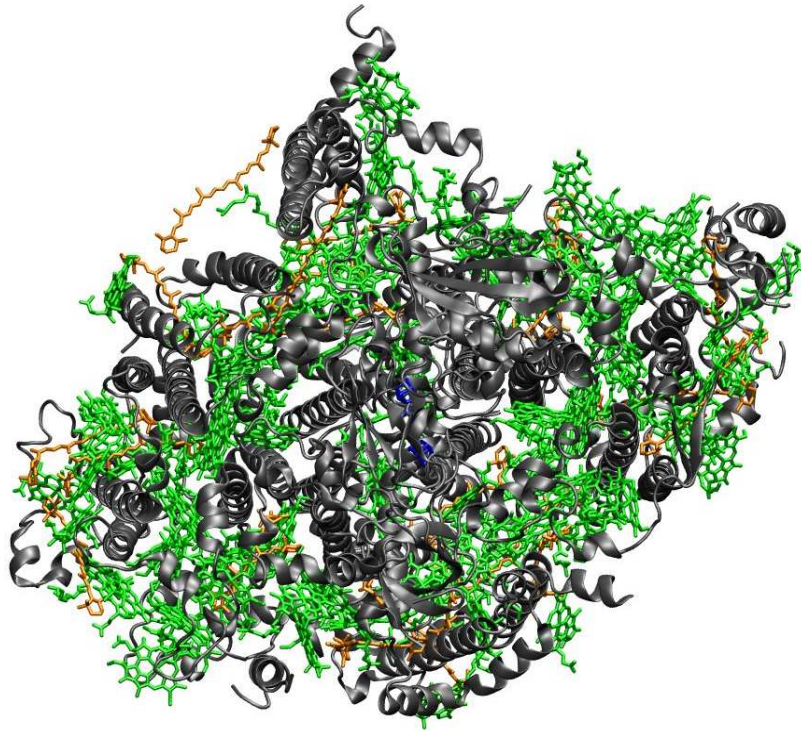
## 2.4 Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe<sup>1-3, 5</sup>

Da in dieser Arbeit die Energieübertragung der Lichtsammelpigmente untersucht wurde, ist im folgenden Abschnitt der Aufbau der Photosysteme und Lichtsammelkomplexe dargestellt.

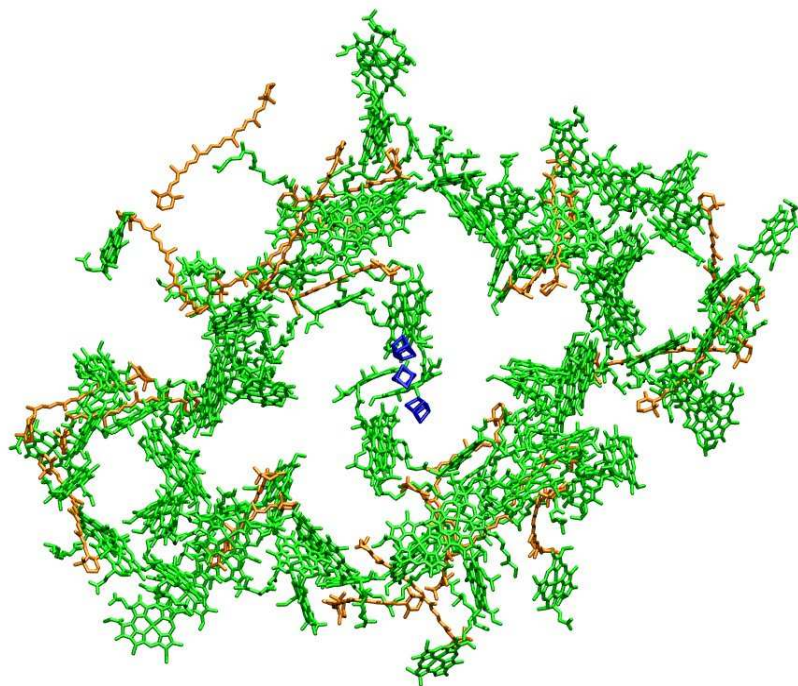
### 2.4.1 Photosystem I

Das monomere PSI ist aus 12 Proteinen aufgebaut und besitzt 96 Chlorophyll a Moleküle und 22  $\beta$ -Carotin Moleküle als Lichtsammelpigmente, die tief in die Thylakoidmembran eingebettet sind (Abbildung 2 - 5). Außerdem enthält es zwei Phyllochinone, drei 4Fe-4S-Cluster und vier Lipide.





C



D

Abbildung 2 - 5: Darstellung des monomeren PSI-Komplex in der Seitenansicht (A, B) und der Aufsicht (C, D) jeweils mit (A, C) und ohne (B, D) Proteingerüst in grau nach Jordan *et al*<sup>7</sup>. Außerdem sind Chlorophyll a (grün),  $\beta$ -Carotin (orange) und 4Fe-4S-Cluster (blau) abgebildet.

## 2 Theoretische Grundlagen

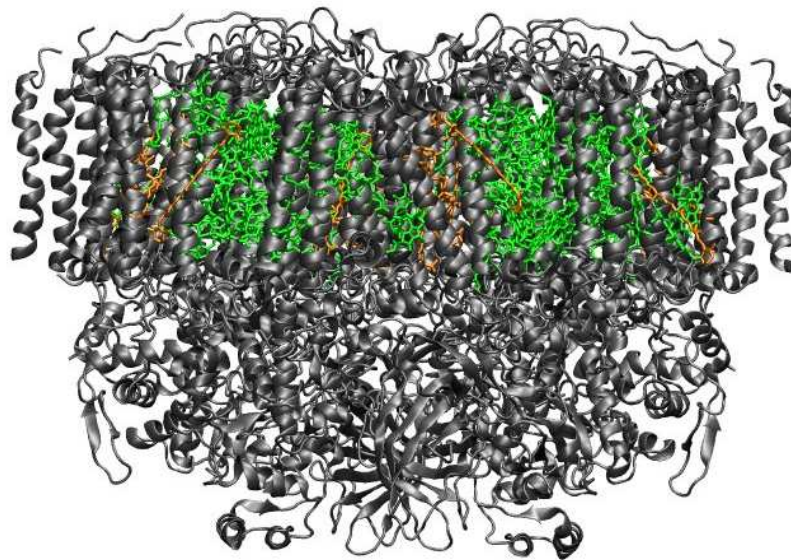
Das Reaktionszentrum des PSI besteht aus einem heterodimeren Protein Kern Komplex von zwei in die Membran integrierten ca. 82 kDa Proteinen PsaA und PsaB. In deren Zentrum befindet sich wiederum das *special pair*, die beiden Chlorophyll a Moleküle, deren Absorptionsmaximum bei 700 nm liegt. Außerdem enthält PSI zehn weitere Proteinketten, welche für die Bindung an das Ferredoxin verantwortlich sind. In Pflanzen liegt PSI als Trimer vor, dessen scheibenförmige Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,5 Å im Jahr 2001 von Jordan *et al* veröffentlicht wurde.<sup>7</sup>

Im Thylakoid kommt PSI vor allem in den ungestapelten Bereichen der Membran vor, da so das im Stroma vorkommende  $\text{NADP}^+$  für die Reduktion leichter zugänglich ist.<sup>5</sup>

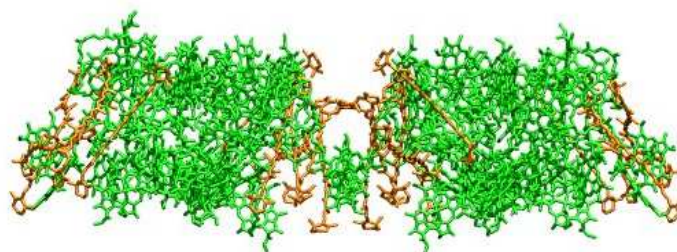


### 2.4.2 Photosystem II

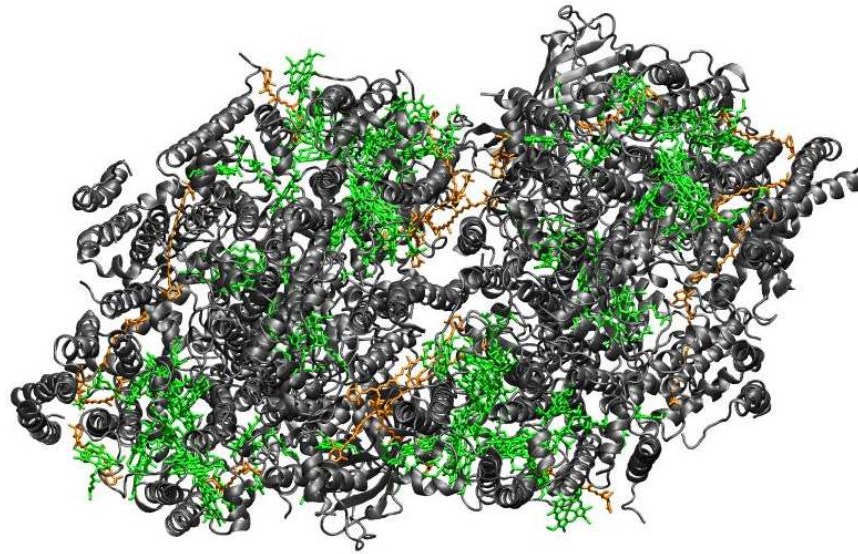
PSII kommt in der Natur als Dimer vor, wobei die beiden Photosysteme eng miteinander verbunden sind und so eine große Einheit bilden.<sup>8</sup> Es besteht pro Monomereinheit aus 20 Proteinuntereinheiten, in denen 35 Chlorophyll a Moleküle und elf  $\beta$ -Carotin-Moleküle lokalisiert sind (Abbildung 2 - 6). Im Kern des PSII befindet sich das Reaktionszentrum, das aus den Proteinen D1 (PsbA) und D2 (PsbD) besteht, die sich über die Thylakoidmembran erstrecken. An diese Proteine sind die beiden Chlorophyll a Moleküle, die das *special pair* bilden, gebunden. Außerdem enthält das pflanzliche PSII im Gegensatz zum bakteriellen eine Vielzahl von zusätzlichen Proteinuntereinheiten, die Chlorophyll gebunden haben. Dadurch wird die Effizienz der Lichtabsorption gesteigert. PSII liegt in den gestapelten Bereichen der Thylakoidmembran vor, denn sowohl das polare Wassermolekül als auch das stark lipidlösliche PQ können in diesen Raum vordringen.<sup>5</sup>



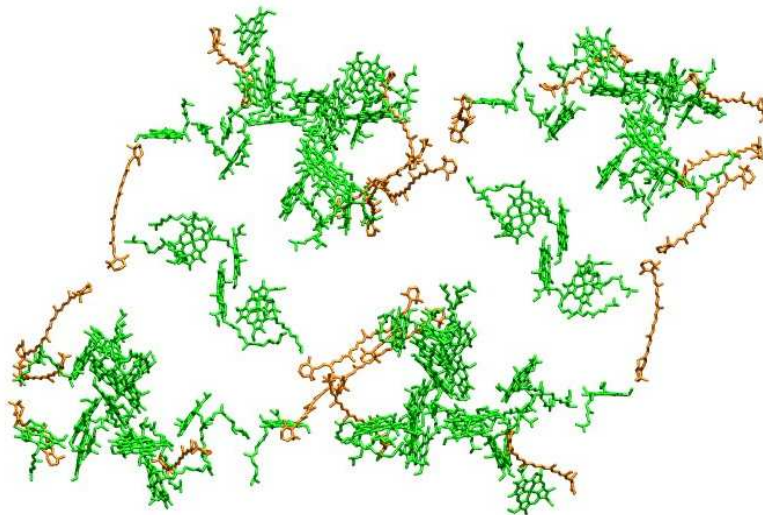
A



B



C



D

**Abbildung 2 - 6: Darstellung des PSII-Dimers in der Seitenansicht (A, B) und der Aufsicht (C ,D) jeweils mit (A, C) und ohne (B, D) Proteingerüst in grau nach Loll *et al.*<sup>9</sup> Außerdem sind Chlorophyll a (grün) und  $\beta$ -Carotin (orange) abgebildet.**

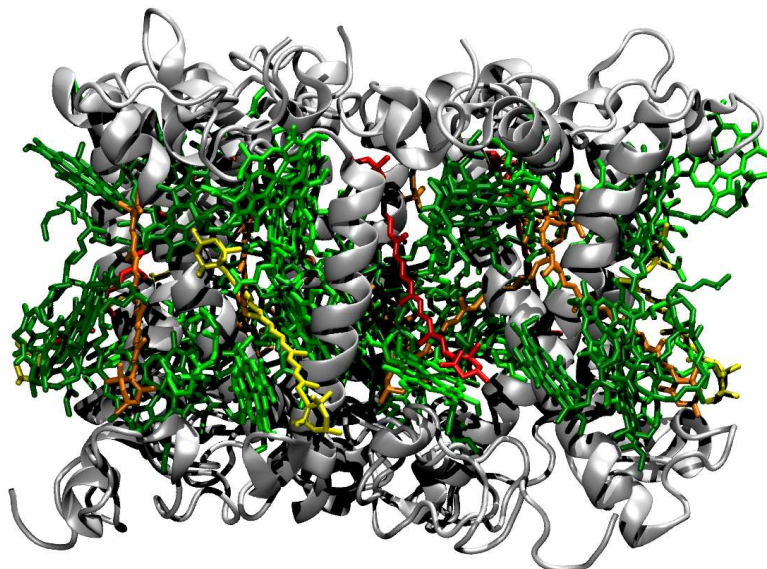
Die Kristallstruktur des PSII von *Thermosynechococcus elongatus* konnte 2005 von Loll *et al.* mit einer Auflösung von 3,2 Å dargestellt werden, für die Cofaktoren konnte sogar ein Auflösung von 3,0 Å erzielt werden.<sup>9, 10</sup>



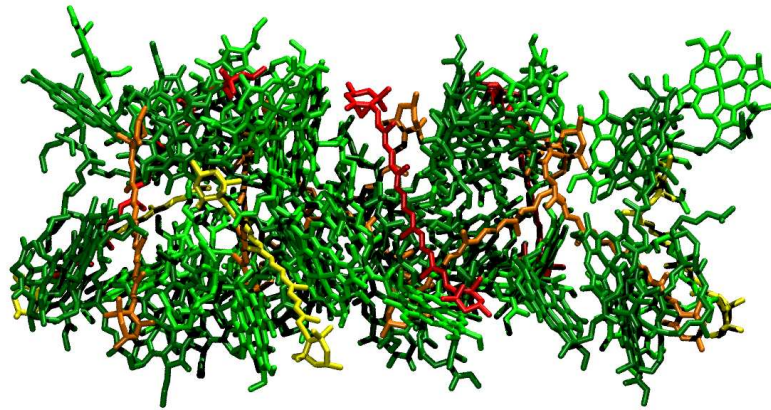
### 2.4.3 Lichtsammelkomplexe

Die Lichtsammelkomplexe sind Transmembranproteine in den Thylakoiden, die Licht absorbieren und es zum Reaktionszentrum weiterleiten. Sie umgeben jeweils einen der beiden Photosysteme und werden auch als *Light Harvesting Complex I* (LHCI) und *Light Harvesting Complex II* (LHCII) bezeichnet. LHCII ist der wichtigste Lichtsammelkomplex in höheren Pflanzen und vielen Algen und zählt zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen der Erde.

Im Jahr 2005 veröffentlichte Kühlbrandt *et al.* die Röntgenstrukturanalyse des LHCII von Erbsen mit einer Auflösung von 2,5 Å (Abbildung 2 - 7).<sup>11</sup> Diese ergab eine Zusammensetzung des monomeren Komplexes aus insgesamt 14 Chlorophyllen, wovon acht Moleküle Chlorophyll a und sechs Moleküle Chlorophyll b sind. Zusätzlich sind vier Carotinoide, bestehend aus zwei Lutein, einem Neoxanthin und einem Carotinoid des Xantophyll-Zyklus, enthalten. Alle Lichtsammelkomplexe haben zwei Bindungsstellen für Carotinoide, die mit L1 und L2 bezeichnet werden, LHCII besitzt außerdem noch zwei weitere Bindungsstellen für Carotinoide, die N1 und V1 genannt werden.<sup>12</sup> Die beiden Lutein-Moleküle liegen überkreuzt vor, um die Stabilität des Komplexes zu erhöhen. Außerdem besteht der Komplex aus fünf  $\alpha$ -Helices, wobei drei davon transmembranal vorliegen. LHCII kommt in der Natur als Trimer vor und ist in die Thylakoidmembran einbettet.<sup>11, 13</sup>



A



B

Abbildung 2 - 7: Darstellung des Lichtsammelkomplex II -Trimer in der Seitenansicht mit (A) und ohne (B) Proteingerüst in grau nach Standfuss *et al.*<sup>11</sup> Außerdem sind Chlorophyll a (dunkelgrün), Chlorophyll b (hellgrün), Lutein (orange), Neoxanthin (gelb) und Xanthophylle (rot) abgebildet.

Eine schematische Aufsicht auf den Superkomplex aus PSII und LHCII in Spinat ist in der Abbildung 2 - 8 zu sehen.<sup>5</sup>

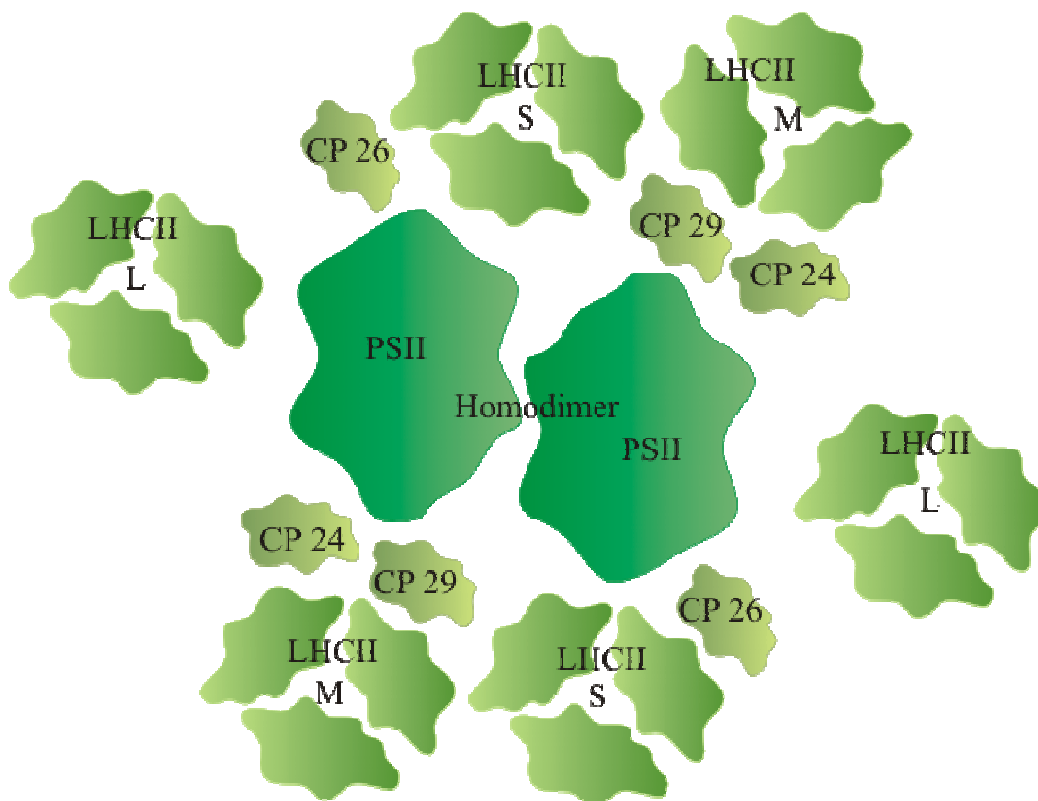


Abbildung 2 - 8: Schematische Aufsicht auf den PSII-LHCII-Superkomplex nach Dekker *et al.*<sup>5</sup> Die LHCII-Trimere sind unterschiedlich stark (S, M, L) an das PSII-Homodimer gebunden. Die kleinen Lichtsammelkomplexe CP 29, CP 26 und CP 24 sind peripher an den zentralen PSII angelagert.

## 2 Theoretische Grundlagen

In der Mitte des Superkomplexes befindet sich der Kernkomplex des PSII als Homodimer und einige kleinere Proteine (Chlorophyll bindende Proteine, CP). Er ist umgeben von sechs peripheren LHCII-Trimeren, die mit S, M und L gekennzeichnet sind, welches die jeweilige Bindungsstärke an diesen Komplex beschreiben (S = strongly bound, M = moderately bound und L = loosely bound). Die LHCII-Trimere, die mit L gekennzeichnet sind, wurden bis jetzt nur in Spinat gefunden. Außerdem sind in der Peripherie dieses Superkomplexes noch drei weitere, kleinere CP gebunden, die näher am PSII lokalisiert sind. Sie kommen als Monomere vor und werden nach ihrer Molekülmasse benannt. Sie binden auch verschieden viele Moleküle der Chlorophylle a und b und auch Carotinoide, wie Lutein, Neoxanthin und Carotinoiden des Xantophyll-Zykluses.<sup>5, 14</sup> Generell befinden sich in der Umgebung vom PSII-Superkomplex noch weitere nur schwach gebundene LHCII-Trimere, weshalb verschiedene Zusammensetzungen für den Superkomplex veröffentlicht wurden.<sup>5</sup> Der Superkomplex enthält ungefähr 200 Chlorophylle.<sup>15</sup> Eine dreidimensionale Struktur des Superkomplexes bei einer Auflösung von 24 Å wurde auf Grund von Bildern eines Kryo-Electron Mikroskops durch Einzel-Partikel Analyse konstruiert.<sup>16</sup>

Außerdem können zwei PSII-LHCII-Superkomplexe miteinander assoziieren und so Megakomplexe entstehen, die in verschiedensten Anordnungen vorliegen können. Dabei bildet sich entweder eine Benachbarung der PS II oder der entsprechenden LHCII aus, es sind auch schon Sandwichkomplexe beobachtet worden.<sup>5</sup>

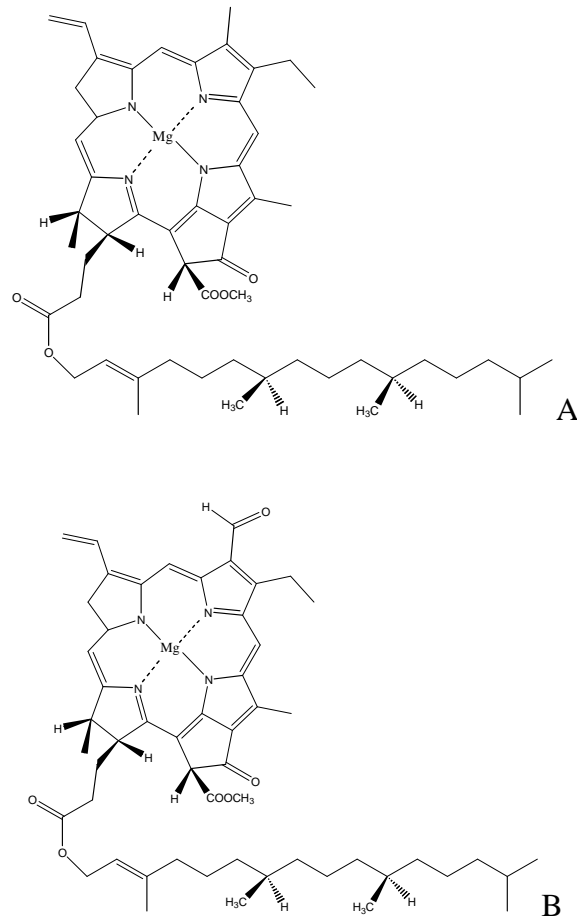
### 2.5 Pigmente und Proteine der Lichtsammelkomplexe<sup>1-3,5</sup>

#### 2.5.1 Chlorophylle

Chlorophylle sind eine große Gruppe der wichtigen Lichtsammelpigmente, sie werden dabei unterteilt in pflanzliche Chlorophylle (a-d) und Bakteriochlorophylle (a-g). Für die Aufklärung der Struktur der Chlorophylle bekam Hans Fischer 1930 den Chemie-Nobelpreis. Sie sind quadratische-planare Moleküle, mit einer Seitenlänge von 10 Å und bestehen aus einem Porphyrine-Grundgerüst, welches an dem Pyrrol-Ring D eine Einfachbindung statt einer Doppelbindung enthält. An der 17<sup>3</sup>-Position im Pyrrol-Ring D besitzen fast alle Chlorophylle eine mit Phytol veresterte Säuregruppe. Als Mg-Zentralatom ist an die vier Stickstoffatome koordiniert. Ihre dreidimensionale Struktur und die geringe Entfernung zu anderen Chlorophyll-Molekülen führen zu einer bedeutenden Rolle in der Weiterleitung der aufgenommenen Lichtenergie, die auf der Femtosekunden Zeitskala abläuft. Durch diese sehr schnellen Prozesse wird die Abgabe der Energie als Wärme vermindert und steuert die Weiterleitung der Energie innerhalb weniger Pikosekunden an die Reaktionszentren, wo dann die Ladungstrennung erfolgt.

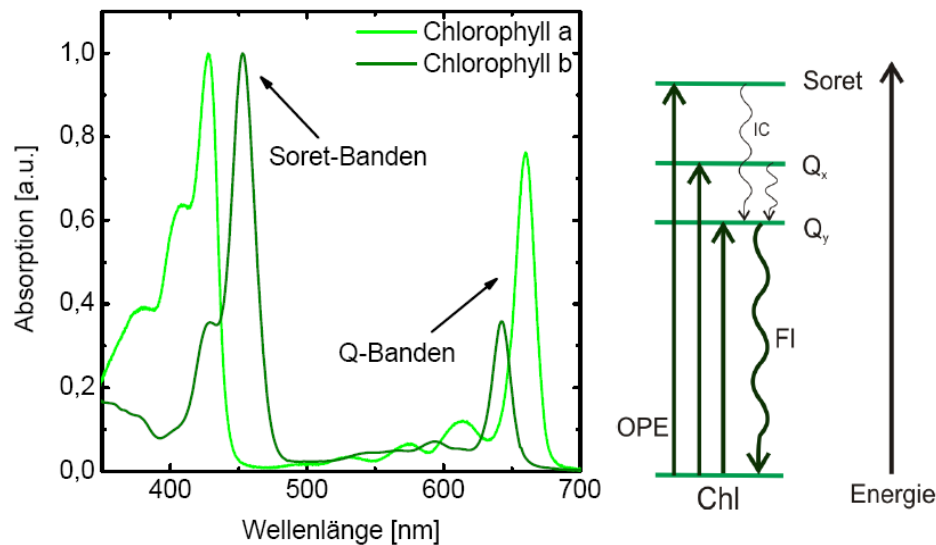
Die für die Photosynthese wichtigen, in höheren Pflanzen vorkommenden Chlorophylle sind Chlorophyll a und Chlorophyll b. Sie unterscheiden sich nur durch ihre Substituenten an der C<sup>7</sup>-Position des Pyrrol-Ringes B. Chlorophyll a besitzt an dieser Position einen Methylsubstituenten, während Chlorophyll b dort eine Formylgruppe gebunden hat (Abbildung 2 - 9). Durch die Vergrößerung des delokalisierten  $\pi$ -Systems verschiebt sich das Absorptionsspektrum der Chlorophylle und ermöglicht so den höheren Pflanzen die Nutzung eines größeren spektralen Bereichs des Sonnenlichtes.

## 2 Theoretische Grundlagen



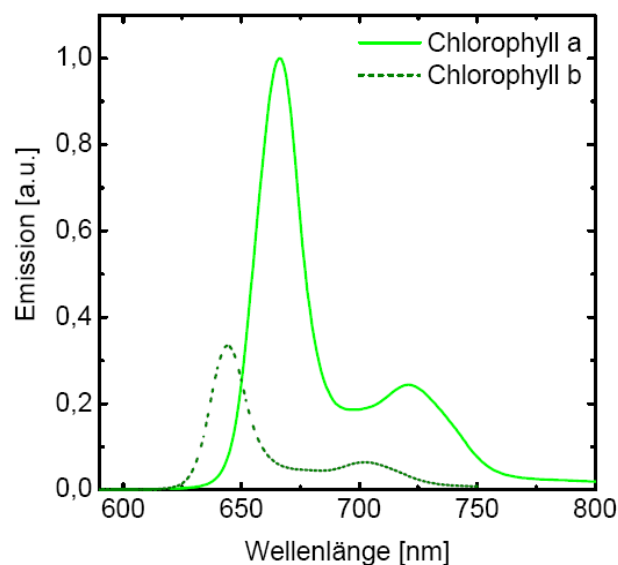
**Abbildung 2 - 9: Strukturformel der Chlorophylle, A: Chlorophyll a, B: Chlorophyll b (nach R.E. Blankenship<sup>1</sup>)**

Die Absorptionsspektren zeigen zwei Hauptabsorptionsbanden im blauen Wellenlängenbereich, die auch als Soret-Banden bezeichnet werden und zwei im roten Bereich, die Q<sub>x</sub>- und Q<sub>y</sub>-Banden (Abbildung 2 - 10). Bei diesen Absorptionsbanden handelt es sich um  $\pi - \pi^*$  Übergänge der Elektronen im konjugierten  $\pi$ -System. Da keine Absorption im Bereich von 500 nm – 600 nm stattfindet, erscheint die Farbe der Pflanzenblätter grün. Die elektronischen Übergänge des Chlorophylls sind durch Übergangsdipolmomente mit verschiedenen Stärken und Orientierungen gekennzeichnet. Die Soret-Bande beruht auf einem Singulett-Übergang  $S_0 \rightarrow S_3$ , während Q<sub>y</sub> die Singulett-Übergänge  $S_0 \rightarrow S_1$  sowie Q<sub>x</sub> die Singulett-Übergänge  $S_0 \rightarrow S_2$  beschreibt. Im Energieschema ist zu erkennen, dass durch Internal Conversion (IC) die durch die Chlorophylle aufgenommene Energie aus den S<sub>2</sub> und S<sub>3</sub>-Niveaus in den S<sub>1</sub>-Zustand übergeht, um von dort an das Reaktionszentrum des entsprechenden Photosystems weitergeleitet oder als Fluoreszenz abgegeben zu werden.



**Abbildung 2 - 10:** links: Absorptionsspektrum der Chlorophylle a und b, rechts: vereinfachtes Energieniveauschema des Chlorophyll a. Prozesse, die durch Intersystem crossing ablaufen, wurden nicht dargestellt.<sup>17</sup>

Für die Untersuchung photosynthetischer Prozesse ist die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz eine etabliert Standardanalyse, wobei daraus vor allem Aussagen über PSII getroffen werden können. Durch Energieübertragung von Chlorophyll b auf das energetisch tiefer liegende S<sub>1</sub>-Niveau des Chlorophyll a in Lichtsammelkomplexen tritt Fluoreszenz des Chlorophyll b nicht auf und ist nur zur Vollständigkeit aufgeführt (Abbildung 2 - 11).



**Abbildung 2 - 11:** Fluoreszenzspektrum der Chlorophylle a und b in Diethylether. Die Fluoreszenz des Chlorophylls b tritt in natürlichen Systemen nicht auf, da die Energie auf niedrig liegende Energieniveaus des Chlorophyll a übertragen wird.<sup>17</sup>

### 2.5.2 Carotinoide<sup>14, 18</sup>

Die zweite Gruppe der Lichtsammelpigmente sind die Carotinoide. Sie kommen in allen photosynthetisch aktiven Organismen vor und können in verschiedenen Derivaten vorliegen. Die Vielfalt der in der Natur vorkommenden Carotinoide kann im Herbst an der Veränderung der Laubfärbung beobachtet werden, da in den Chloroplasten zuerst die Chlorophylle abgebaut werden und so die übrigbleibenden Carotinoide die rötliche Färbung der Blätter bewirken. Die in den höheren Pflanzen vorkommenden Carotinoide zeigen strukturelle Ähnlichkeiten, wie ein lineares, verschieden langes konjugiertes C-C Doppelbindungssystem, das bei den meisten in der all-trans Form vorliegt und üblicherweise eine Ring-Verbindung an beiden Enden der linearen Kette. Durch diese endständigen Ringe wird die sterische Form des Moleküls entscheidend bestimmt und somit die Reaktionsmöglichkeiten mit Proteinen kontrolliert. In höheren Pflanzen werden aber nur fünf verschiedene Carotinoide, wie Lutein,  $\beta$ -Carotin, Neoxanthin, Violaxanthin und Zeaxanthin, in den Lichtsammelkomplexen akkumuliert.<sup>14</sup> Die Biosynthese der Carotinoide läuft in Multienzymkomplexen ab, Xanthophylle werden aus Carotinoiden durch die enzymatische Einführung von Sauerstoffatomen synthetisiert (Abbildung 2 - 12). Nach der Bildung der letzten gemeinsamen Vorstufe Lycopin können zwei Wege der Biosynthese der Xanthophylle unterschieden werden. Die eine Gruppe von Xanthophyllen leitet sich vom  $\alpha$ -Carotin ( $\beta$ ,  $\epsilon$ -Carotin) ab, dabei entsteht das in Pflanzen in hohen Konzentrationen vorliegende Lutein. Die anderen Xanthophyllcarotinoide werden aus  $\beta$ -Carotin gebildet und beinhalten die Pigmente des Xanthophyll-Zyklus, wie Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin sowie Neoxanthin.

## 2 Theoretische Grundlagen

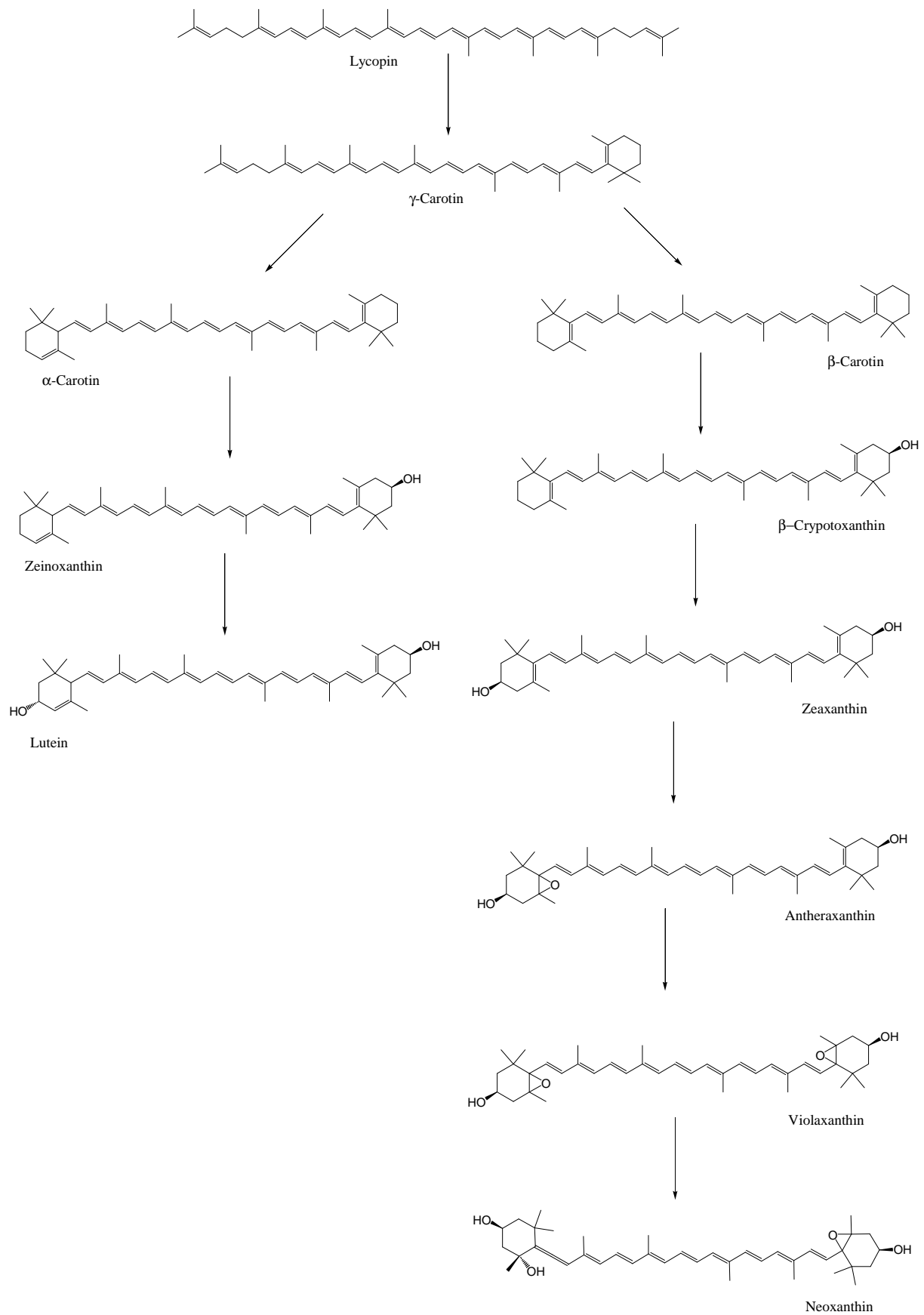
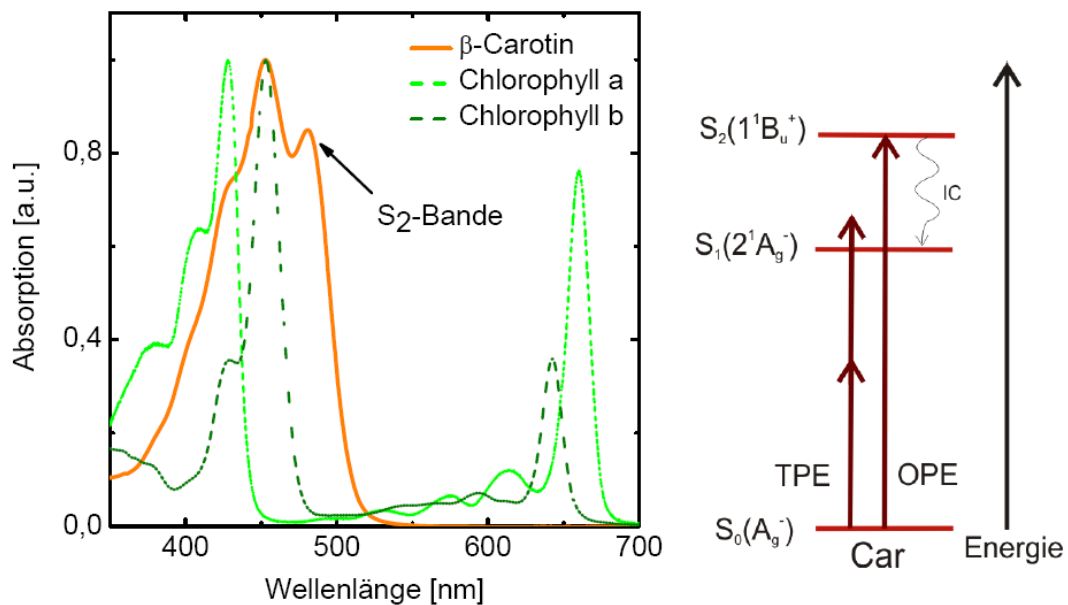


Abbildung 2 - 12: Biosynthese der Xanthophylle<sup>19</sup>



## 2 Theoretische Grundlagen

Carotinoide zeigen starke Absorption im Bereich von 400 nm - 500 nm, woraus sich die charakteristische rote, orange oder gelbe Färbung ergibt (Abbildung 2 - 13). Da sie in einem anderen Wellenlängenbereich als die Chlorophylle absorbieren, vergrößert sich so das für die Pflanzen nutzbare Spektrum des Sonnenlichts. Carotinoide tragen etwa 20 % - 30 % zum Lichtsammelvermögen der Pflanzen bei. Die von den Carotinoiden absorbierte Energie wird an Chlorophylle weitergeleitet und dann zum Reaktionszentrum des jeweiligen Photosystems transferriert. Ein Teil der Energie wird auch wieder als Chlorophyll-Fluoreszenz abgeführt.<sup>20</sup>



**Abbildung 2 - 13: links: Absorptionsspektrum von Chlorophyll a, Chlorophyll b und β-Carotin, rechts: vereinfachtes Energieniveauschema der Carotinoide. Der S<sub>1</sub>-Zustand kann nur über Zweiphotonenanregung (TPE) direkt angeregt werden.<sup>17</sup>**

Spektroskopisch betrachtet zeigen Carotinoide ein besonderes Verhalten. Die Moleküle können näherungsweise als Polyene betrachtet werden. Sie weisen ein Inversionszentrum und ein C<sub>2</sub>-Achse auf, das bedeutet, dass sowohl der Grundzustand (S<sub>0</sub>) als auch der erste angeregte Zustand (S<sub>1</sub>) eine A<sub>g</sub><sup>-</sup> Symmetrie besitzen. Deshalb ist der Übergang vom S<sub>0</sub>- in den S<sub>1</sub>-Zustand für Einphotonen-Übergänge nach der Laporte-Regel symmetrieverboten und Carotinoide weisen bei diesem Übergang kaum Absorption oder Fluoreszenz auf. Die Banden im Absorptionsspektrum entstehen deswegen durch den Übergang vom Grundzustand in den zweiten angeregten Zustand S<sub>2</sub>, welcher symmetrieerlaubt ist. Der S<sub>1</sub>-Zustand lässt sich aus diesen Gründen nur mit Hilfe von Zweiphotonen-Absorptionen untersuchen, da wegen der dabei geltenden umgekehrten Auswahlregeln eine direkte Anregung möglich ist.<sup>21</sup>

## 2 Theoretische Grundlagen

Für den in den Lichtsammelkomplexen ablaufenden Energietransfer von Carotinoiden zu Chlorophyllen gibt es zwei verschiedene Wege (Abbildung 2 - 14). Entweder erfolgt eine Übertragung direkt aus dem angeregten zweiten Zustand ( $S_2$ ) oder nach Internal Conversion aus dem für die Einphotonenanregung verbotenen Zustand  $S_1$ .<sup>22, 23</sup>

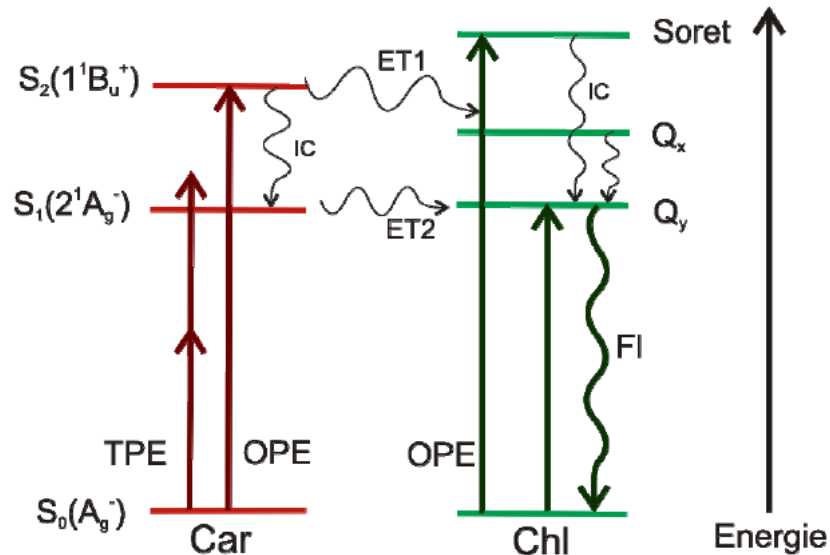


Abbildung 2 - 14: Energieniveau-Schema der angeregten Zustände von Carotinoiden und Chlorophyllen mit den möglichen Energieübertragungswegen, ET2 und ET1.<sup>17</sup>

Die Regulation des Energietransfers in den Lichtsammelkomplexen wird von den Carotinoiden ausgeführt. Dieser Prozess wird durch die Xanthophyll-Carotinoide gesteuert und verhindert so die Aufnahme von überschüssiger Lichtenergie. Die Carotinoide des Xanthophyll-Zyklus sind Violaxanthin, Antheraxanthin und Zeaxanthin, sie werden dabei in einem enzymatischen Prozess durch Deepoxidierungs- oder Epoxidierungsreaktionen ineinander umgewandelt (Abbildung 2 - 15).<sup>12</sup> Durch den Ablauf der Lichtreaktion der Photosynthese werden im Lumen der Thylakoide Protonen freigesetzt, je höher die Lichteinstrahlung ist, desto niedriger wird der pH-Wert des Lumens. Durch diese Änderung wird das Enzym Violaxanthin-Deepoxidase aktiviert und der Xanthophyll-Zyklus läuft an, wobei aus Violaxanthin mit neuen konjugierten Doppelbindungen in zwei Schritten Zeaxanthin mit elf konjugierten Doppelbindungen gebildet wird. Bei Lichtmangel reduziert sich die Menge der Protonen im Thylakoidlumen, der pH-Wert steigt und das Enzym Epoxidase wandelt Zeaxanthin zu Violaxanthin um. Durch diese Variation der konjugierten Doppelbindungen der Xanthophyll-Carotinoide kommt es zu einer Absenkung des Energieniveaus  $S_1$  bei Lichtüberschuss oder zu einer Anhebung des Energieniveaus  $S_1$  bei

## 2 Theoretische Grundlagen

Lichtmangel.<sup>24</sup> Dadurch kann bei starker Lichteinstrahlung ein Energietransfer von den Chlorophyllen auf die Carotinoide stattfinden, es wird also überschüssige Energie von den Reaktionszentren ferngehalten, um die Bildung von Singulett-Sauerstoff zu verhindern. Dieser Schutzmechanismus wird als *non-photochemical quenching* (NPQ) bezeichnet. Zeaxanthin gibt die so aufgenommene Energie als Wärme oder Fluoreszenz an die Umgebung ab. Bei schwacher Lichteinstrahlung wird die Energieübertragung von den Carotinoiden zu den Chlorophyllen begünstigt und Violaxanthin erhöht durch die Absorption des Sonnenlichtes die Photosyntheseleistung der Pflanze. Dieser Mechanismus wird auch als *molecular gear shift model* bezeichnet.<sup>25</sup> Andere Messungen und Berechnungen haben ergeben, dass die Energieniveaus von Violaxanthin und Zeaxanthin fast identisch sind<sup>26, 27</sup>, aber trotzdem ist experimentell gezeigt worden, dass eine Energieübertragung vom S<sub>1</sub>-Niveau der Chlorophyllen zum S<sub>1</sub>-Niveau von Zeaxanthin als Mechanismus für effektives NPQ stattfindet<sup>28</sup>, da durch die Bindung von Zeaxanthin an die Lichtsammelkomplexe eine Konformationsänderung induziert werden könnte und deshalb der Energietransfer verstärkt abläuft.<sup>29</sup> Die Kinetik des NPQ wird unter anderem über die Menge der in der Pflanze vorliegenden Xanthophylle bedingt.<sup>30</sup> Die schützende Rolle der Xanthophyll-Carotinoide ist seit vielen Jahren Gegenstand aktueller Forschung in der Photosynthese.<sup>31-39</sup>

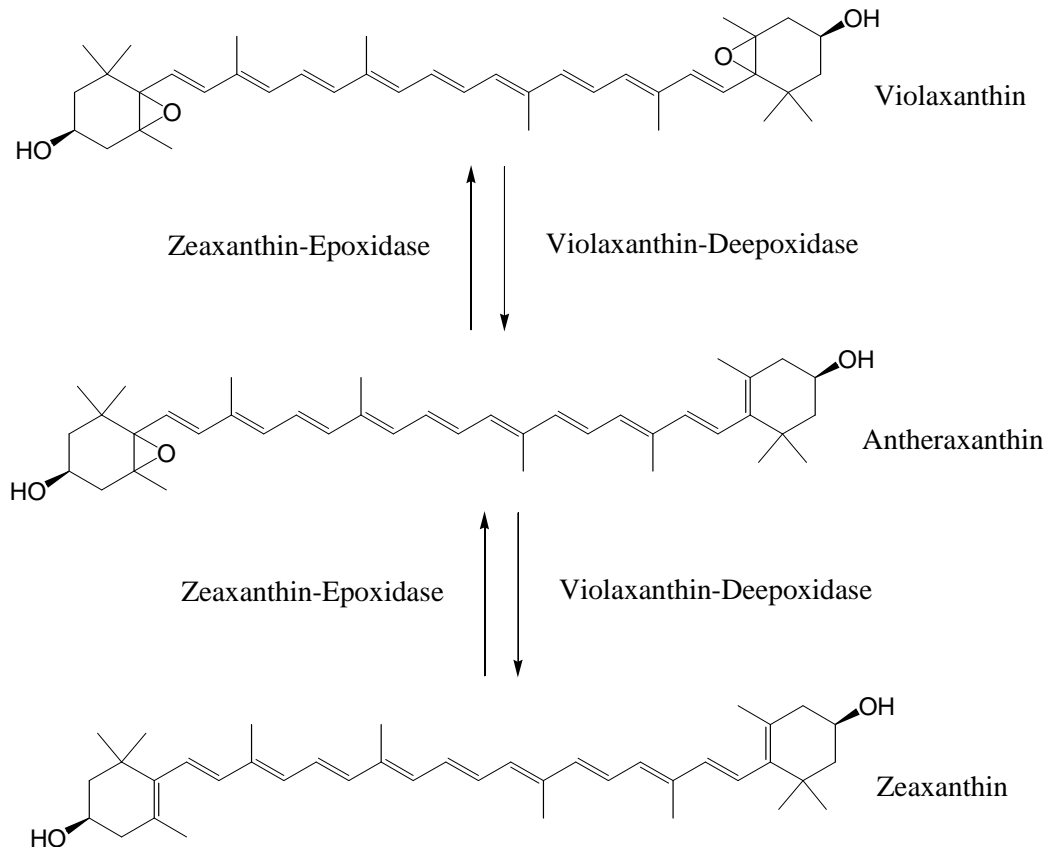


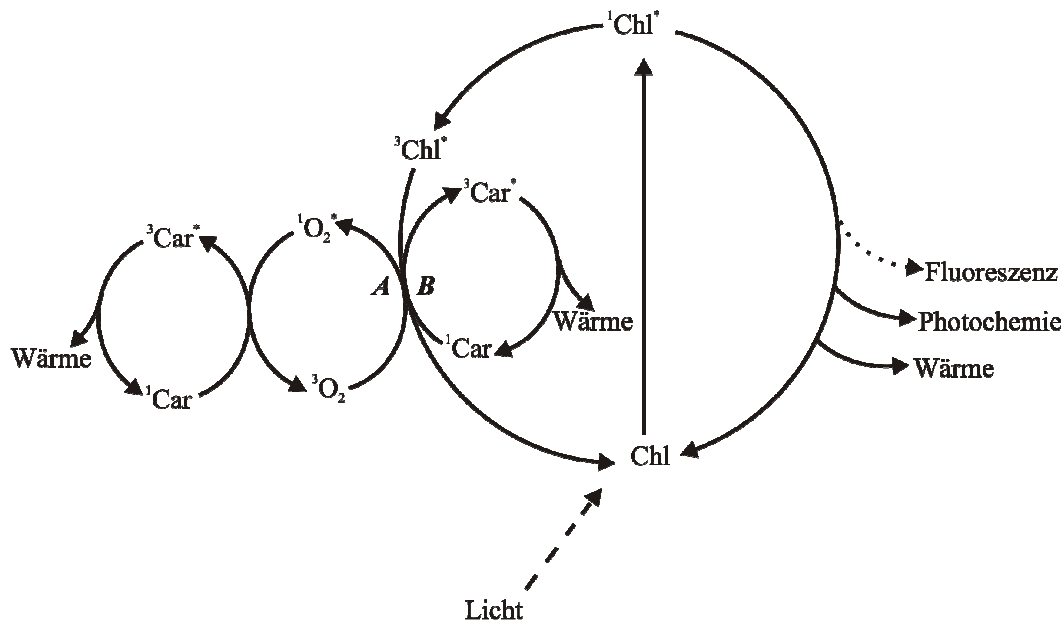
Abbildung 2 - 15: Enzymatischer Ablauf des Xanthophyll-Zyklus<sup>34</sup>

## 2 Theoretische Grundlagen

Die periphere Bindungsstelle V1 von LHCII bindet hauptsächlich Violaxanthin. Die Xanthophylle, die an dieser Stelle gebunden werden, sind ineffektiv für die Energieübertragung, dagegen wird bei niedrigem pH-Wert der Xanthophyllligand von dieser Position freigesetzt und so zur Deepoxidierung im Xanthophyll-Zyklus bereitgestellt.<sup>40</sup> Ähnliche Vorgänge laufen auch in anderen Lichtsammelkomplexen ab. In den Thylakoiden entsteht so freies Violaxanthin als Substrat für den Xanthophyll-Zyklus und außerdem eine frei Bindungsstelle für das neu gebildete Zeaxanthin.<sup>29</sup> Das durch den Xanthophyll Zyklus gebildete Zeaxanthin wird an zwei Positionen im Thylakoid gefunden, entweder gebunden an die Lichtsammelkomplexe oder frei in der Membran, wo es als Schutz der Lipide vor Peroxidation dient.<sup>41</sup> Generell sind nur ca. 60 % des Violaxanthin für die enzymatische Umwandlung zu Zeaxanthin verfügbar.<sup>42</sup>

Lutein ist das neben  $\beta$ -Carotin am weitesten verbreitete Carotinoid in den Chloroplasten, es zählt wegen seiner sauerstoffhaltigen Struktur auch zu den Xanthophyllen. Lutein ist ein wichtiger struktureller Bestandteil der Photosysteme.<sup>19, 43</sup> Es bindet an die L1 Position in LHCII, welche unentbehrlich für die Proteinfaltung und das Quenchen von Triplett-Chlorophyllen ist. Auch die L2 Position kann von Lutein, aber auch anderen Xanthophyll-Carotinoiden besetzt werden.<sup>44</sup> Die beiden Lutein Moleküle an den verschiedenen Bindungsstellen besitzen unterschiedliche Konformationen und könnten daher auch unterschiedliche Funktionen einnehmen.<sup>45, 46</sup>

Die zweite wichtige Funktion der Carotinoide ist die Photoprotektion, dabei werden die bei der Photosynthese entstandene Triplett-Chlorophylle ( $^3\text{Chl}$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) abgefangen, außerdem wird Oxidation der Lipide verhindert. Durch starke Sonneneinstrahlung kommt es bei der Photosynthese zum Intersystem Crossing (ISC) bei den Chlorophyllen, es bilden sich Triplett-Chlorophylle. Durch Energieabgabe entsteht aus diesen mit Triplett-Sauerstoff sehr reaktiver Singulett-Sauerstoff. Durch sein sehr hohes Oxidationsvermögen können Chloroplasten beschädigt werden. Carotinoide nehmen durch ihren niedrig liegenden Triplettzustand die Energie des Singulett-Sauerstoffes auf und geben sie als Wärmestrahlung wieder ab, die Pflanzen werden so vor Schäden durch Oxidation geschützt (Abbildung 2 - 16). Da viele verschiedene Typen von Carotinoiden in den Chloroplasten vorliegen, existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Energieniveaus, die die schädliche Energie des Singulett-Sauerstoffes aufnehmen können.



**Abbildung 2 - 16: Abbauwege von angeregten Chlorophyllmolekülen. Die Prozesse der rechten Seite sind direkt voneinander abhängig.<sup>32, 34</sup>**

### 2.5.3 PsbS

Dieses Protein gehört zur erweiterten Chlorophyll a/b-bindenden (Cab) Proteinfamilie und wird innerhalb dieser zur Gruppe der *early light-induced proteins* (ELIP) zugeordnet, welche als kurzlebige kerncodierte Proteine der Thylakoidmembran definiert sind. Sie haben die Fähigkeit sich bei Lichtstress innerhalb der Membran höherer Pflanzen anzureichern, um so das Reaktionszentrum zu schützen, indem die überschüssige Energie abgeleitet wird.

PsbS bezeichnet die S-Untereinheit des Photosystems II und wird auch CP22 genannt. Die Struktur von PsbS weicht von andern Cab-Proteinen ab, da es vier transmembrane Helices besitzt.<sup>47</sup> Pro PSII Reaktionszentrum von Spinat Thylakoiden liegen zwei PsbS Untereinheiten vor.<sup>48</sup> Es ist auch in Abwesenheit von Chlorophyllen und Carotinoiden stabil und gegen Proteasen geschützt, weshalb es als transients Chlorophyll-Carrier fungieren könnte.<sup>48, 49</sup> Es wird vermutet, dass es in der mit LHCII angereicherten Umgebung lokalisiert ist, die den LHCII-PSII-Superkomplex mit der Membran verbindet.<sup>15</sup> Andere Untersuchungen führten zur Annahme, dass PsbS im Kern des LHCII-PSII-Superkomplexes zu finden ist, aber es wurde bis jetzt nie in Kristallen von PSII nachgewiesen.<sup>50</sup> Das könnte aber auch bedeuten, dass PsbS in mehreren Positionen im Superkomplex zu finden ist.<sup>51</sup> Außerdem wurde in Erwägung gezogen, dass PsbS als ein Lichtsammelprotein fungiert, wobei immer noch

umstritten ist, ob es Chlorophylle bindet kann.<sup>52</sup> Akzeptiert ist dagegen die Tatsache, dass PsbS in die Umwandlung von überschüssiger Energie in Hitze involviert ist (NPQ), da Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, in denen kein PsbS exprimiert wird, nur sehr wenig NPQ betreiben können.<sup>53</sup> Von Bergantino *et al.* wurde vorgeschlagen, dass NPQ von der Umwandlung vom PsbS-Dimer zum PsbS-Monomer begleitet wird. Die Bildung des Monomers wird durch starke Lichteinstrahlung induziert. Dadurch wird wahrscheinlich ein hydrophober Phenylalaninring des PsbS freigelegt und kann als Bindungsstelle für Zeaxanthin dienen,<sup>51</sup> was *in vitro* von Aspinall-O'Dea *et al.* gezeigt wurde<sup>54</sup> und mit Ergebnissen aus *in vivo* Untersuchungen übereinstimmt.<sup>55</sup> PsbS wirkt als ein Baustein, der auf den pH-Wert des Lumens mit einer Konformationsänderung reagiert und dadurch in einen quenchenden Zustand übergeht.<sup>51</sup> Für die volle Aktivierung von PsbS ist sowohl Zeaxanthin als auch Lutein nötig,<sup>56</sup> wobei in der Dunkelheit die beiden Bindungsstellen des PsbS mit Lutein besetzt sind und während der Lichteinstrahlung durch Zeaxanthin substituiert werden.<sup>57</sup> Das Model in dem PsbS als Quencher fungiert wird von Bonente *et al.* abgelehnt, stattdessen wird das Model eines Protonensensors für PsbS, der dadurch andere Quenchingmoleküle aktiviert, bestärkt.<sup>57</sup> Bei diesem PsbS-Trigger-Model entsteht das Abführen der überschüssigen Energie durch die Bindung von Zeaxanthin an Proteine der Lichtsammelkomplexe. Die Protonierung und die daraus resultierenden Konformationsänderung des PsbS verursacht ein Konformationsänderung der benachbarten Proteine der Lichtsammelkomplexe gefolgt von der Bindung von Zeaxanthin an diese.<sup>29, 58</sup> Dieses Model wird favorisiert, da die Bindung von Zeaxanthin an PsbS noch umstritten ist.<sup>48, 52, 54</sup> In Mutanten, denen spezielle Glutamat-Reste fehlten, die als Messfühler für den pH-Wertes gelten, ist ein Verlust der NPQ-Kapazität festgestellt worden.<sup>59</sup> Generell sind die Pigmentbindenden Eigenschaften des PsbS von großer Bedeutung, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion von PsbS haben, denn wenn PsbS sowohl Chlorophylle als auch Carotinoide bindet, wäre es zur direkten Ableitung der überschüssige Energie fähig. Bindet PsbS dagegen keine dieser Pigmente kann seine Funktion nur in der Regulation des Quenchen von benachbarten Proteinen liegen.<sup>29</sup>

### 2.6 Quenching Prozesse<sup>1, 2, 5</sup>

Pflanzen sind verschiedenen Lichtintensitäten ausgesetzt und müssen sich im Laufe eines Tages, aber auch innerhalb eines Jahres an diese anpassen. Übersteigt die Lichtintensität die Kapazität der Pflanze für Photosynthese, werden Chlorophylle in angeregten Zuständen angehäuft und hochreaktiver Sauerstoff kann entstehen, dieser kann Membranen, Pigmente oder Proteine beschädigen. Um diese oxidativen Nebenprozesse zu unterbinden, wird die Überschussenergie effizient als Wärme abgeleitet. Dieser Prozess, der bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist, wird als nichtphotochemisches Quenchen (NPQ) bezeichnet. Zur Untersuchung dieses Prozesses dient die Chlorophyll-Fluoreszenz, die abhängig von anderen Relaxationsprozessen, wie Photochemie und Wärmedissipation, aber auch der Bildung von Triplett-Chlorophyllen, ist. Die Fluoreszenz macht dabei aber nur einen kleinen Teil von etwa 0,6 % - 3 % der gesamten absorbierten Energiemenge aus.<sup>60</sup> Da sie aber leicht zugänglich ist, wurde sie zu einem akzeptierten Hilfsmittel für die Bestimmung der Effizienz der Photochemie und Wärmeabführung in Pflanzen.<sup>61, 62</sup> Die Energieabgabe durch Bildung von Triplett-Chlorophyllen hat dagegen mit 4 % - 25 % der absorbierten Photonen einen größeren Einfluss.<sup>32</sup>

Photochemie und auch die Wärmeabgabe minimieren die Fluoreszenzquantenausbeute, die gesamte Löschung der Fluoreszenz (quenchen) besteht aus der Summe von photochemischem Quenching (qP) und nicht-photochemischem Quenching (NPQ). Durch Messen der Fluoreszenz lässt sich die thermische Dissipation der überschüssigen Anregungsenergie feststellen, wenn dabei kurze Lichtpulse eingesetzt werden, die die Reaktionen des photochemischen Energieweges sättigen. NPQ lässt sich in drei verschiedene Komponenten unterteilen, die durch verschiedene Relaxationskinetiken nach einer Beleuchtungsphase definiert sind.

Der Hauptanteil mit der schnellsten Relaxationskinetik ist das pH- oder Energieabhängige Quenchen (qE), das durch den pH-Gradienten der Thylakoidmembran unter Starklichteinfluss induziert wird. Durch die Kontrolle des pH –Wertes im Thylakoid wird die Induktion oder die Aufhebung von qE getriggert, so kann innerhalb von Sekunden auf wechselnde Lichteinflüsse reagiert werden. Ein Modell erklärt das Auftreten von qE über die Verringerung des pH-Wertes im Lumen, das zur Protonierung der PSII Proteine und Aktivierung des Xanthophyll-Zyklus führt. Durch die Protonierung und Bindung von Xanthophyllen an spezifische Stellen am PSII wird eine Konformationsänderung ausgelöst und PSII liegt in einem Zustand

vor, der eine kürzere <sup>1</sup>Chlorophyll Lebensdauer und eine kleiner Fluoreszenzquantenausbeute hat, da die Anregungsenergie als Wärme abgeführt wird.<sup>32, 35</sup> Ein anderes Model beschreibt qE als Quenching, das abläuft, da die Anregungsenergie zu Zeaxanthin transferiert wird und von dort als Wärme abgegeben wird.<sup>63</sup> Das Zeaxanthin eine wichtigen Beitrag zu qE leistet, ist durch verschiedene Experimente bewiesen worden.<sup>5, 29, 31-37, 40, 55-58, 64</sup> Im physiologischen pH-Bereich hängt die Bildung von qE hauptsächlich von der Gegenwart von Zeaxanthin ab, es sind dafür aber schon ein bis zwei Moleküle Zeaxanthin ausreichend.<sup>55</sup> Außerdem wird die Rolle von PsbS für qE untersucht. Dabei gibt es einige Publikationen, die zeigen, dass PsbS notwendig ist oder die qE-Kapazität von der stöchiometrischen Präsenz von PsbS abhängt,<sup>51, 53, 65</sup> aber andere Ergebnisse zeigen, dass die Zeaxanthin-Abhängigkeit von qE nicht auf PsbS beruht<sup>57</sup>. Generell konnte NPQ nicht in isolierten PSII Membranen (BBY-Partikel), PSII Kernen oder Reaktionszentren nachgewiesen werden.<sup>51</sup>

Der zweiter Anteil von NPQ ist das state-transition Quenching (qT), welches innerhalb von einigen Minuten abklingt und die Verteilung der Energie zwischen den beiden Photosystemen regelt, dabei wird durch Umorientierungen der beweglichen Lichtsammelkomplexe eine Verkleinerung des Absorptionsquerschnitts erreicht. Es stellt einen wichtigen Faktor in vielen Algen dar und hat eine Relaxationshalbwertszeit im Dunkeln von ungefähr 8 Minuten.<sup>66</sup> Die Entkopplung der Lichtsammelkomplexe von PSII geschieht durch die Phosphorylierung der Photosysteme, wodurch der Betrag der Anregungsenergie im PSII reduziert wird, der als Fluoreszenz abgeführt wird.<sup>32</sup> Dieser Quenching-Mechanismus kann meist vernachlässigt werden, da er nur bei geringen Lichtintensitäten wichtig ist, denn bei hohen Lichtintensitäten wird die Entkopplung durch den hohen pH-Gradienten unterbunden.<sup>63</sup>

Die dritte Komponente des NPQ ist qI. Diese Photoinhibition der Photosynthese durch teilweise Inaktivierung von PSII zeigt die langsamste Relaxation.<sup>32</sup> Bei langer Einwirkungsdauer von hohen Lichtintensitäten auf die Pflanze wird qI zum Hauptfaktor von NPQ.<sup>63</sup> Zum Teil wird qI durch die Inaktivierung des D1 Proteins im PSII Reaktionszentrum bedingt<sup>67</sup>, ein weiterer Teil von qI ist die Bindung von Zeaxanthin an die Lichtsammelantennen von PSII.<sup>68</sup>



### 2.7 Energietransfermechanismen

Im photosynthetischen Prozess wird die von Chlorophyllen oder Carotinoiden aufgenommene Energie an die Reaktionszentren weitergeleitet. Da die Pigmente und die Reaktionszentren in einem Abstand von einigen hundert Angström zueinander befinden, kann die Energie nur schrittweise von Pigment zu Pigment in Richtung des Reaktionszentrums übertragen werden. Für eine effektive Energieübertragung muss dabei die Geschwindigkeit des Energietransfers wesentlich größer sein, als die Lebensdauer des angeregten Zustands der involvierten Pigmente. Der Energietransfer erfolgt über strahlungslose Mechanismen durch die Wechselwirkungen der beteiligten Pigmente und läuft innerhalb von zehn bis einigen hundert Pikosekunden ab.<sup>69</sup>

Der einfachste Fall eines Energietransfers ist die Emission eines Photons des Donormoleküls und die darauffolgende Absorption des Photons von einem Akzeptormolekül. Bei diesem Übergang sind die Interaktionen der beiden Moleküle zu vernachlässigen.

Der bei der Photosynthese stattfindende Prozess ist jedoch eine strahlungslose Energieübertragung, die bei schwach gebundenen, benachbarten Pigmenten stattfindet und als Förster-Energietransfer bezeichnet wird. Dabei wird durch die Bewegung des angeregten Elektrons des einen Moleküls ein oszillierendes Dipolmoment erzeugt, wodurch die Elektronensysteme der benachbarten Moleküle beeinflusst werden. Im Resonanzfall der benachbarten Moleküle kann so Energie übertragen werden. Das Elektron des Donormoleküls liegt nach der Energieübertragung im Grundzustand vor, während im Akzeptormolekül ein Elektron angeregt wurde. Der Förster-Energietransfer gilt für schwache Dipol-Dipol Wechselwirkungen bei Abständen größer als 20 Å. Er beschreibt den Energietransfer in Abhängigkeit der relativen Orientierung und dem Abstand.

$$k_e = k_f \left( \frac{R_0}{R} \right)^6 \quad \text{Gl. 10}$$

Dabei ist  $k_e$  die Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung für den Energietransfer vom Donor- zum Akzeptormolekül und  $k_f$  die Geschwindigkeitskonstante für die Fluoreszenz des Donors. Der Radius  $R$  beschreibt den Abstand von Donor- zu Akzeptormolekül und  $R_0$  ist der Försterradius, der den Abstand für ein Donor-Akzeptor-Paar beschreibt, bei dem die

## 2 Theoretische Grundlagen

Übergangswahrscheinlichkeit 50 % beträgt. Der Försterradius in Angström ist für jedes Donor-Akzeptor-Paar gegeben durch folgende Gleichung.

$$R_0^6 = \frac{8,79 \cdot 10^{-5} J \kappa^2}{n^4} \quad \text{Gl. 11}$$

In dieser Formel beschreibt J die spektrale Überlappung von Donor und Akzeptor, n den Brechungsindex des dielektrischen Mediums und  $\kappa$  ist ein Faktor, der die Orientierung der beiden Moleküle zueinander darstellt.

Der Orientierungsfaktor  $\kappa$  ist definiert durch den Winkel  $\alpha$  zwischen den Übergangsdipolen und dem Winkel  $\beta$  der die Verbindungslinie des Donor-Akzeptorpaars und dem jeweiligen Dipol einschließt.

$$\kappa^2 = (\cos \alpha - 3 \cos \beta_1 \cos \beta_2)^2 \quad \text{Gl. 12}$$

Die spektrale Überlappung J ergibt sich durch das Integral aus dem Produkt des normierten Fluoreszenzspektrums  $F_D$  des Donors und des Absorptionsspektrums  $\varepsilon_A$  des Akzeptors über der Wellenlänge  $\lambda$ .

$$J = \int \varepsilon_A(\lambda) F_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad \text{Gl. 13}$$

Wobei trotz des Einflusses der Emissions- und Absorptionsspektren der Energietransfer strahlungslos abläuft. Aber auch für eine strahlungslose Energieübertragung müssen Donor- und Akzeptormolekül gleiche Energieniveaus besitzen, da auch bei diesem Prozess der Energieerhaltungssatz erfüllt sein muss. Auch die Auswahlregeln für Elektronenübergänge gelten für den Försterenergie transfer, daher ist der Singulett<sub>Donor</sub> – Singulett<sub>Akzeptor</sub> - Übergang am häufigsten zu beobachten. Während der Singulett<sub>Donor</sub> - Triplett<sub>Akzeptor</sub> - Übergang sehr unwahrscheinlich ist, da die Phosphoreszenz Quantenausbeute des Donors meist zu gering ist.<sup>1, 20, 70</sup>

Der Dexter-Energietransfer beschreibt statt einer Energieübertragung eine Elektronenübertragung, dafür wurde die Förster-Theorie um einen Elektronenaustauschterm erweitert. Dabei wird ein angeregtes Elektron des Donormoleküls in das LUMO des Akzeptors übertragen, gleichzeitig findet ein Übergang eines Elektrons aus dem HOMO des Akzeptors auf das Donormolekül statt. Für diese Elektronenübertragung ist die direkte Überlappung der

## 2 Theoretische Grundlagen

Wellenfunktionen von Donor- und Akzeptormolekül notwendig, wodurch der Abstand der beiden Moleküle sehr viel geringer sein muss als beim Förster-Energietransfer.

Der Dexter-Energietransfer ist definiert durch folgende Gleichung:

$$k = K \cdot J \cdot e^{\frac{-2R}{L}} \quad \text{Gl. 14}$$

Dabei ist R der Abstand von Donor- und Akzeptormolekül, J ist das oben beschriebene spektrale Überlappingsintegral, K beschreibt einen Faktor zur Orbitalüberlappung und L ist definiert als die Summe der Van-der-Waals-Radien. Der Dexter-Energietransfer tritt nur bei Donor-Akzeptor-Abständen unter 20 Å auf, außerdem ist neben dem Singulett<sub>Donor</sub> – Singulett<sub>Akzeptor</sub> – Transfer auch ein Triplett<sub>Donor</sub> – Triplett<sub>Akzeptor</sub> - Transfer erlaubt.<sup>71</sup>

In photosynthetischen Systemen spielen sowohl Förster-Energietransfer als auch Dexter-Energietransfer eine Rolle, wobei der Förster-Mechanismus wegen seiner größeren Reichweite die Energietransferreaktionen dominiert. Die Singulett<sub>Donor</sub> – Singulett<sub>Akzeptor</sub> – Transferreaktionen der Chlorophylle laufen hauptsächlich nach dem Förster-Mechanismus ab. Die Energieübertragung von Singulett<sub>Carotinoid</sub> – Singulett<sub>Chlorophyll</sub> ist dagegen für den Förster-Energietransfer symmetrieverboten und dürfte deshalb nicht über größere Abstände funktionieren. Doch die Einbeziehung von Multipolwechselwirkungen oder ein partielles Vermischen der S<sub>1</sub>- und S<sub>2</sub>-Niveaus der Carotinoide lässt eine Beschreibung nach dem Förster-Energietransfer zu.<sup>72, 73</sup>

Aber die Energieübertragung von Triplett<sub>Chlorophyllen</sub> und Singulett<sub>Sauerstoff</sub> auf Carotinoide als Schutz vor Photooxidation findet nach dem Dexter-Mechanismus statt.<sup>20</sup>

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Pflanzen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen wurden an *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Diese Pflanze wird seit Mitte des letzten Jahrhunderts als Modellpflanze vor allem in der Genetik eingesetzt, da sie einige wichtige Vorteile gegenüber anderen Pflanzen bietet. Entscheidende Vorzüge für unsere Experimente waren dabei hauptsächlich der kurze Generationszyklus von ungefähr 8 Wochen, die einfache Kultivierung auf relativ kleinem Raum und die breit Übereinstimmung mit der Physiologie vor allem der Lichtphysiologie von höheren Pflanzen.<sup>74</sup> Außerdem sind bereits viele Mutanten bekannt und in Stock-Centern erhältlich.

Die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen vom Ecotyp Columbia 0 wuchsen in nährstoffarmer Erde, bei einer konstanten Temperatur von 21°C und mit einer Luftfeuchtigkeit von 70 %. Die Lichtintensitäten und -bedingungen variierten für die verschiedenen Mutanten.

### 3.2 Mutanten

Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* haben eine veränderte Zusammensetzung der Lichtsammelkomplexe. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen, bei *npq1*, *npq2* und *lut2* wird jeweils ein Xanthophyll nicht gebildet und bei *npq4* und *wt+PsbS* ist die Konzentration des vorhandenen PsbS verändert. Bei den ersten beiden Mutanten ist das Enzym des Xanthophyllzyklus defekt, deshalb kann *npq1* kein Zeaxanthin bilden und *npq2* besitzt von den Xanthophyllcarotinoiden nur Zeaxanthin.<sup>75</sup> Die *lut2* Mutante kann wegen eines Defektes der Lycopin  $\epsilon$ -Cyclase kein Lutein und keine  $\alpha$ -Carotine erzeugen, sie verfügt stattdessen aber über mehr  $\beta$ -Carotine und Xanthophyll-Pigmente.<sup>19, 76</sup> Die Mutationen der Pflanzen mit veränderlichem PsbS Gehalt lassen sich für *npq4* auf eine einzelne Mutation durch Fehlen des entsprechenden Gens zurückführen und bei *wt+PsbS* durch eine Überexpression von PsbS, ausgelöst durch einen endogenen Promoter, der das PsbS-Gen enthält.<sup>53, 77</sup> Durch das Vermessen von Wildtyp und genannten Mutanten können so Hinweise auf die Beteiligung der Xanthophylle oder PsbS am Quenching der überschüssigen Energie in Pflanzen gewonnen werden.

Die als erstes untersuchten Pflanzen *wt*, *npq1* und *npq2* wurden bei NASC (European Arabidopsis Stock Center) gekauft. Diese Mutanten wuchsen unter Langtagbedingungen, d.h. 14 Stunden Helligkeit und 10 Stunden Dunkelheit, bei Lichtintensitäten von  $200 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  auf. Die später untersuchten Pflanzen *wt*, *lut2*, *npq4* und *wt+PsbS* wurden von Kris Niyogi (University of California, Berkeley, USA) bereitgestellt. Sie wurden bei Lichtintensitäten von ca.  $80 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bei Kurztagbedingungen von 14 Stunden Dunkelheit und 10 Stunden Helligkeit gezüchtet. Dies hatte zur Folge, dass der Generationszyklus der Pflanzen, die im Kurztag gewachsen waren sehr viel länger dauerte als bei Pflanzen aus Langtagbedingungen.

### 3.3 Pulse-Amplitude-Modulation

Durch Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz können detaillierte Informationen über die photosynthetischen Vorgänge in Pflanzen gewonnen werden. Vorallem kann durch diese Fluoreszenz die Effektivität der primären Energieumwandlung gemessen werden.

Die Zusammenhänge von Fluoreszenzsignal und der Umwandlung der aufgenommenen Energie wurden von Hans Kautsky und seinen Mitarbeitern zum ersten Mal 1931 beobachtet und ist heute als Kautsky-Effekt bekannt<sup>78</sup>. Dieser Effekt beruht auf der Abnahme der Fluoreszenz Intensität, wenn eine Pflanze aus der Dunkelheit in eine helle Umgebung gebracht wird. Die Abnahme der Fluoreszenz lässt sich durch die Induktion der Elektronentransport- und Enzymreaktionen erklären. Die überschüssige Energie wird als Fluoreszenz abgegeben. Nach dieser Entdeckung wurde die Analyse der Chlorophyllfluoreszenz zu einem gängigen Werkzeug in der Erforschung der Photosynthese und Mitte der achtziger Jahre wurde das Pulse-Amplitude-Modulation Fluorometer (PAM) entwickelt, um die Chlorophyll Fluoreszenz besser zu detektieren. Dieses Fluoreszenzsignal spiegelt aber nur Veränderungen, die in der Photochemie des PSII entstehen, wider.

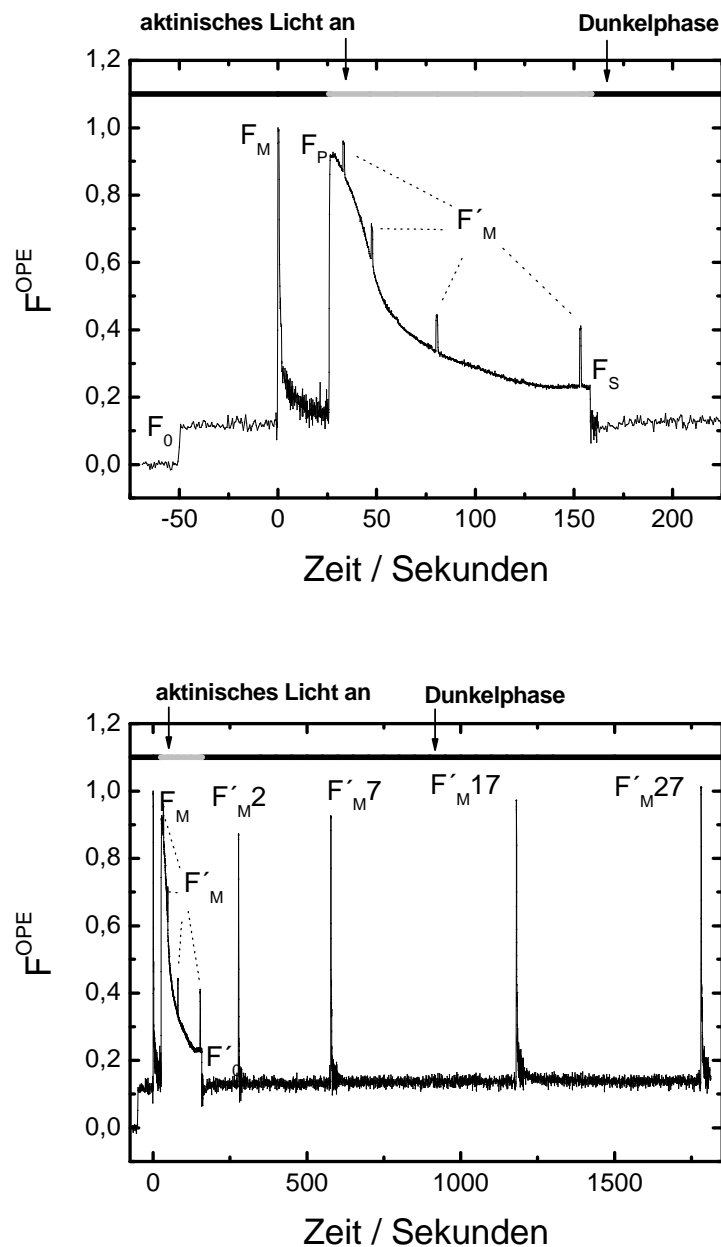
Das PAM Fluorometer vereint die folgenden Eigenschaften in einem Instrument. Durch die  $\mu\text{s}$  Pulse des Messlichtes bei niedrigen Frequenzen entstehen hohe pro Puls Intensitäten, die aber nicht zu einer hohen Fluoreszenzausbeute führen. Die durch die Anregung entstandenen  $\mu\text{s}$  Fluoreszenzpulse werden von einer ultraschnellen Photodiode mit einem großen Linearitätsbereich detektiert. Außerdem wird das vorverstärkte Signal durch einen weiteren Verstärker, der nur die Signalveränderung während des Anregungspulses und kurz danach

verstärkt, verbessert. Durch die Nutzung von moduliertem Licht ist es elektronisch sehr einfach möglich, das Fluoreszenzsignal von dem aktinischen Licht zu trennen.

In das PAM Fluorometer sind drei verschiedene Lichtquellen eingebaut, die von der zentralen Steuereinheit aus bedient werden können. Das modulierte Licht einer LED mit einer Wellenlänge von 594 nm hat sehr geringe Intensitäten um keine Fluoreszenzkinetik zu induzieren. Außerdem ist eine Halogenlampe, die das Sonnenlicht imitiert, in das PAM Fluorometer installiert, die sowohl für die Bestrahlung der Probe mit aktinischem Licht als auch mit sättigenden Lichtpulsen gebraucht wird. Für das aktinische Licht wird die Halogenlampe mit reduzierter Leistung versorgt, die Intensität kann dabei von 0 bis 2500  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  variiert werden. Dagegen ist die Intensität der sättigenden Lichtpulse von 0 bis 12000  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  einstellbar. Die dritte Lichtquelle des PAM Fluorometers ist eine LED, die Licht im infraroten Bereich bei einer Zentralwellenlänge von 720 nm emittiert.

Um mit einem PAM Fluorometer Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen durchführen zu können, muß die Pflanze vor der messung mindestens 30 Minuten in Dunkelheit stehen. Durch diese Dunkeladaption kommen sämtliche Prozesse der Lichtreaktion zum Erliegen und die Pflanzen liegen so in einem vergleichbaren Zustand vor. Als erstes wird das Blatt mit dem modulierten Licht bestrahlt, um die Grundfluoreszenz  $F_0$  von dunkeladaptierten Blättern zu bestimmen (Abbildung 3 - 1). Danach folgt ein sättigender Lichtpuls der Halogenlampe zur Bestimmung der maximalen Fluoreszenz  $F_M$  des Blattes. Nach diesem Lichtpuls wird die infrarote LED für einige Sekunden angeschaltet, dies wird nur vom PS I absorbiert und führt zur Entfernung der Elektronen an  $Q_A$ , das Reaktionszentren des PS II wird dadurch wieder in den geöffneten bzw. voll oxidierten Zustand gebracht. Jetzt kann das kontinuierliche aktinische Licht eingeschaltet werden, das im nicht sättigenden Intensitätsbereich betrieben wird. Dadurch können aber nicht alle Chloroplasten des Blattes angeregt werden, vor allem die Chloroplasten im unteren Bereich des Mesophylls werden durch die nicht sättigenden Strahlung nicht erreicht. Die Bestrahlung mit dem aktinischen Licht führt zum Anstieg der Fluoreszenz auf  $F_P$  gefolgt von einem Abfall der Fluoreszenz durch die Anpassung des Blattes an die Helligkeit. Während dieser durch das aktinische Licht induzierten Fluoreszenzkinetik werden weitere sättigende Pulse eingesetzt, um die maximale Fluoreszenz  $F'_M$  während des hell adaptierten Zustandes zu messen. Nachdem die Fluoreszenz ein Plateau erreicht hat, wird das aktinische Licht abgeschaltet und die Infrarote LED für einige Sekunden angeschaltet, um PSII wieder in den oxidierten Zustand zu bringen.<sup>61</sup> Während der folgenden mindestens 20

minütigen Dunkelphase regeneriert sich der Photosyntheseapparat fast vollständig. Um das Verhältnis von  $qE$ ,  $qI$  und  $qT$  zu bestimmen, wird das Blatt auch in der Dunkelphase mit einigen sättigenden Lichtpulsen ( $F'_M2$ ,  $F'_M7$ ,  $F'_M17$ ) bestrahlt.<sup>79</sup>



**Abbildung 3 - 1:** Schematische Darstellung einer gesamten PAM-Messung (unten) und in der Vergrößerung während des belichteten Zustands (oben)

Die photochemischen Prozesse von dunkel adaptierten Blättern, die durch die Chlorophyll Fluoreszenz beobachtet werden, resultieren aus dem PS II. Sie spiegelt Prozesse wieder, die

im LHCII und in den Reaktionszentren ablaufen. Die anfängliche Fluoreszenz  $F_0$  entsteht nur vom LHCII, dagegen sind bei dem Anstieg auf die maximale Fluoreszenz  $F_M$  auch die Reaktionszentren beteiligt. Diese Reaktionszentren sind bei einem dunkel adaptierten Blatt geöffnet, das bedeutet die beiden Elektronenakzeptoren  $Q_A$  und  $Q_B$  liegen in ihrer oxidierten Form vor. Durch die kurze Belichtung mit einem sättigenden Puls werden die PS II Elektronenakzeptoren kurzzeitig reduziert, die photochemischen Prozesse im PSII sind gesättigt und es kann keine weitere Photochemie stattfinden. Die Fluoreszenz steigt deshalb auf dem maximalen Wert  $F_M$  an. Nur während der Verwendung von sättigenden Lichtpulsen sind alle Reaktionszentren geschlossen und die überschüssige Energie wird durch nicht-photochemische Quenchingprozesse aus der Pflanze abgeführt. Eine sinnvolle Aussage über die nicht-photochemische Quenchingkapazität einer Pflanze lässt sich demnach nur unter sättigenden Lichtbedingungen treffen. Die nachfolgende aktinische Belichtung der Blätter bewirkt ein Abfall der Fluoreszenz durch das Eintreten von photochemischen und nicht-photochemischen Quenching Prozessen. Die absorbierte Energie wird vom LHCII zu den Reaktionszentren geleitet, wo eine Ladungstrennung und somit die Reduktion von  $Q_A$  und  $Q_B$  stattfindet. Diese Reaktionszentren werden jetzt als geschlossen bezeichnet, denn es kann keine Ladungstrennung mehr stattfinden und die absorbierte Energie wird vermehrt als Chlorophyll Fluoreszenz und Wärme abgegeben. Jetzt starten verschiedene Prozesse, die dazu führen, dass die Reaktionszentren wieder oxidiert werden und so wieder geöffnet vorliegen. Unter anderem wird die Energie von PSII auf PSI übertragen, es bildet sich ein pH Gradient über die Thylakoid Membran, einige Proteine des Lichtsammelkomplexes werden phosphoreliert und durch die Aktivierung von PSI werden Elektronen von den Akzeptoren  $Q_A$  und  $Q_B$  entfernt. Die Reaktionszentren können jetzt kontinuierlich als Energiefälle wirken, da immer einige der Reaktionszentren reduziert und einige reoxidiert vorliegen. Die Chlorophyll Fluoreszenz sinkt während des Ablaufens der vorher beschriebenen Prozesse immer weiter ab und befindet sich jetzt in einem sehr niedrigen Dauerzustand  $F_s$ , der definiert ist durch die vollständige Umwandlung der aufgenommenen Energie in Photochemie oder Quenching Prozesse.<sup>7, 79</sup> Die Applikation eines sättigenden Lichtpulses führt zur maximalen Fluoreszenz- ausbeute  $F'_M$ , die niedriger ist als der Referenzwert aus dem dunkeladaptierten Zustand  $F_M$ . Da sich das nicht-photochemische Quenchen während des kurzen, sättigenden Pulses nicht ändert, zeigt die Differenz von  $F_M$  zu  $F'_M$  den Betrag des nicht-photochemischen Quenchens an. Nach Abschalten des aktinischen Lichtes wird das Blatt kurzzeitig mit IR-Licht bestrahlt um PSI selektiv anzuregen. Diese selektive Anregung führt dazu, dass die in der



### 3 Materialien und Methoden

Elektronentransportkette vorhandenen Elektronen an das PSI weitergegeben werden und so die Reaktionszentren oxidiert werden. Durch die folgende Dunkeladaption werden alle lichtabhängigen Reaktionen unterbunden, das Ausbleiben von Photochemie führt zu einer Reoxidation der Reaktionszentren und der Elektronenakzeptoren im PSII und auch die verschiedenen Komponenten des NPQ relaxieren auf ihre minimalen Werte. Eine erneute Absorption von Licht kann dann wieder für den Ablauf von Photosynthese genutzt werden.<sup>63, 79</sup>

Generell wird bei der Messung mit dem PAM nur die Intensität des modulierten Fluoreszenzlichtes gemessen. Um im dunkeladaptierten Zustand keine Fluoreszenzkinetiken zu induzieren, beträgt die Frequenz des modulierten Lichtes nur 1,6 kHz. Dagegen wird bei der aktinischen Messung die Modulation automatisch auf 100 kHz erhöht, um ein besseres Signal-Rausch Verhältnis zu erhalten. Für den Vergleich von Messungen verschiedener Pflanzen sind eine Reihe von Chlorophyll Fluoreszenz Parametern entstanden.<sup>79, 80</sup>

Die Abnahme der Chlorophyll Fluoreszenz durch die Belichtung wird auch als Stern-Volmer-Quenchen bezeichnet, dabei können verschiedene Quenchingparamter bestimmt werden. Dabei ist der Quenching-Koeffizient  $q_{sv}$  theoretisch linear korreliert mit der Konzentration eines diffusen Quenchers.<sup>63</sup>

$$q_{sv} = \frac{\Delta F}{F} = \frac{F_M - F}{F} = \frac{F_M}{F} - 1 \quad \text{Gl. 15}$$

Für diese Arbeit ist vor allem der Parameter von Bedeutung, der Aufschluss über das nicht-photochemische Quenchen gibt.<sup>62, 63</sup>

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} = \frac{F_M}{F'_M} - 1 \quad \text{Gl. 16}$$

Dieser NPQ-Faktor beschreibt die gesamte nicht-photochemische Chlorophyll Fluoreszenz und korreliert mit der Entstehung von Zeaxanthin. Außerdem stellt er auch ein Maß für die Umwandlung der überschüssigen Strahlungsenergie in Wärme im PSII-Komplex dar.<sup>80</sup>

### 3.4 Das Lasersystem

Das für die Zweiphotonenanregungen verwendete Lasersystem ist ein kommerziell erhältliches System der Firma Coherent, welches aus drei Komponenten besteht, um so ein möglichst breites Wellenlängenspektrum von 500 nm bis 700 nm und 900 nm bis 2400 nm ausnutzen zu können (Abbildung 3 - 2). Da die mit diesem System gemessenen Pflanzen möglichst wenig durch die Einstrahlung von Licht geschädigt werden sollen, aber trotzdem eine hohe Anregungsleistung benötigt wird, ist es sinnvoll Femtosekunden Laserpulse einzusetzen.

Das verwendete System besteht aus einem Vitesse Duo, in den ein Pumplaser und Oszillator integriert ist. Der Oszillator erzeugt die ultrakurzen Laserpulse, die im RegA 9000, dem regenerativen Verstärker, verstärkt werden. Die dritte Komponente ist der OPA 9400, ein optisch-parametrischer Verstärker, in dem nach Weißlichterzeugung durch nichtlineare optische Effekte eine bestimmte Wellenlänge verstärkt werden kann.

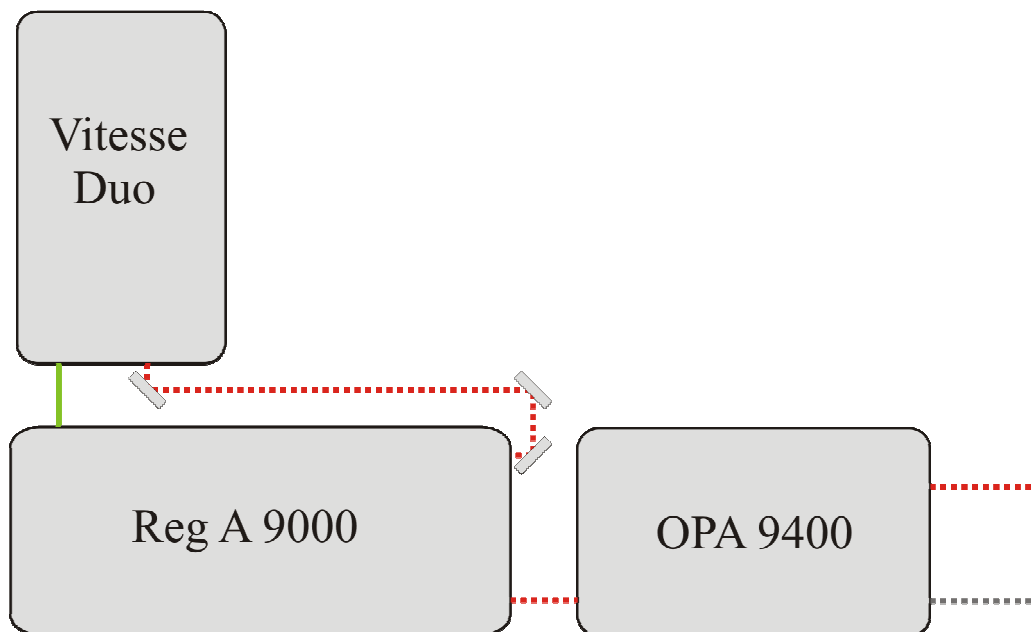


Abbildung 3 - 2: Schematischer Aufbau des Lasersystems der Firma Coherent<sup>83</sup>

#### 3.4.1 Vitesse Duo<sup>81, 82</sup>

Der Vitesse Duo besteht aus einem Vanadat-Festkörperlaser, dem Pumplaser (Verdi), der einen kontinuierlichen Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 532 nm emittiert. Dieser ist kombiniert mit einem passiv-modengekoppelten Ti:Saphir Oszillator, der Femtosekundenpulse mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm erzeugt (Abbildung 3 - 3).

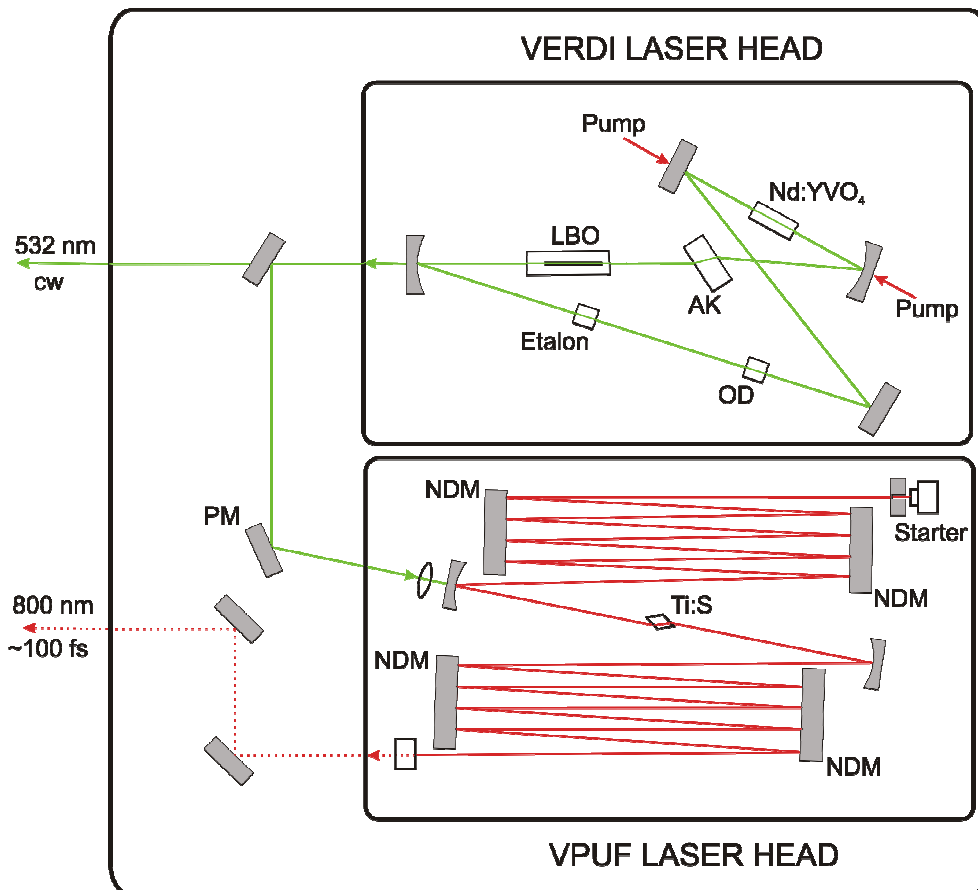


Abbildung 3 - 3: Schematischer Aufbau des Vitesse-Duo<sup>81, 83</sup>

Der Verdi-Laserkopf besitzt einen Nd:YVO-Kristall (Neodym: Yttrium-Vanadat) als Lasermedium eingebaut, das in einer Ringkavität von zwei Laserdioden optisch mit 808 nm gepumpt wird. Nd:YVO besitzt einen hohen Absorptionskoeffizienten für 808 nm und emittiert mit einer sehr hohen Quantenausbeute bei 1064 nm.<sup>81, 84</sup> Durch einen LBO-Kristall ( $\text{LiB}_3\text{O}_5$ ) wird der Laserstrahl auf 532 nm frequenzverdoppelt. Die in die Ringkavität eingebaute optische Diode garantiert unidirektionales Lasen. Die ungewollten Longitudinalmoden, werden durch destruktive Interferenz im Ethalon herausgefiltert. Außerhalb des Verdi-Laserkopfes wird durch einen Strahlteiler ein Teil des 532 nm Laserstrahls aus dem Vitesse Duo ausgegeben. Dieser kontinuierliche Laserstrahl (cw) hat eine Leistung von 10 W. Der andere Teil des 532 nm Laserstrahls wird vom Strahlteiler

reflektiert, auf den Powertrack Spiegel, einen Einkoppelspiegel geleitet, der durch Piezoelemente gesteuert eine optimale Einkopplung bei maximaler Leistung bewirkt. Von dort wird in den VPUF (*Verdi-Pumped Ultra Fast*) Laseroszillator fokussiert, in dem sich eine für den gepulsten Betrieb optimierte Kavität mit einem passiv modengekoppelten Titan-Saphir ( $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ ) Kristall befindet. Der Titan-Saphir Kristall hat sein Verstärkungsmaximum bei 810 nm und wird in diesem System bei 800 nm betrieben. Die passive Modenkopplung wird durch den optischen Kerr-Effekt erlangt, bei dem der Brechungsindex des Kristalls bei hohen Lichtintensitäten linear mit steigender Intensität zunimmt. Dies führt zur Selbstfokussierung des Laserstrahls im Resonator. Wird diese kombiniert mit einem variablen Spalt kann die Modenkopplung zur Erzeugung der Laserpulse stattfinden.<sup>85</sup> Dies geschieht aber nur bei Intensitätsfluktuationen, die zu einem für den Kerr-Linsen-Effekt ausreichenden Maximum führen, um so einen Femtosekundenpuls auszubilden. Diese Intensitätsfluktuationen werden im VPUF Laserkopf durch einen Starter erzeugt, der eine hochfrequente Spannung anlegt und so Modulationen in der Resonatorlänge auslöst. Sobald ein Femtosekundenpuls erzeugt wurde, wird der Starter ausgeschaltet.

Da wegen der Dispersion des Ti:Saphir-Kristalls Licht der verschiedenen Wellenlängen unterschiedliche Laufzeiten haben, entsteht eine verbreiterter Puls (chirp). Dieser wird durch die dispersiven dielektrischen Spiegel (NDM) des Resonators ausgeglichen, indem die optische Weglänge für die langwelligen Anteile des Pulses vergrößert wird.

Im Vitesse Duo entstehen Pulse mit einer Wellenlänge von 800 nm, einer Halbwertsbreite von weniger als 100 fs, einer Repitionsrate von 80 MHz und einer Ausgangsleistung von ca. 110 mW. Die beiden entstanden Laserstrahlen, der kontinuierliche 532 nm Strahl und der Laserpuls mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm werden in den RegA eingekoppelt.

#### 3.4.2 RegA 9000<sup>82, 85, 86</sup>

Der RegA 9000 ist ein regenerativer Verstärker, der die im Vitesse Duo entstandenen Femtosekundenpulse intensitätsunabhängig verstärkt (Abbildung 3 - 4).

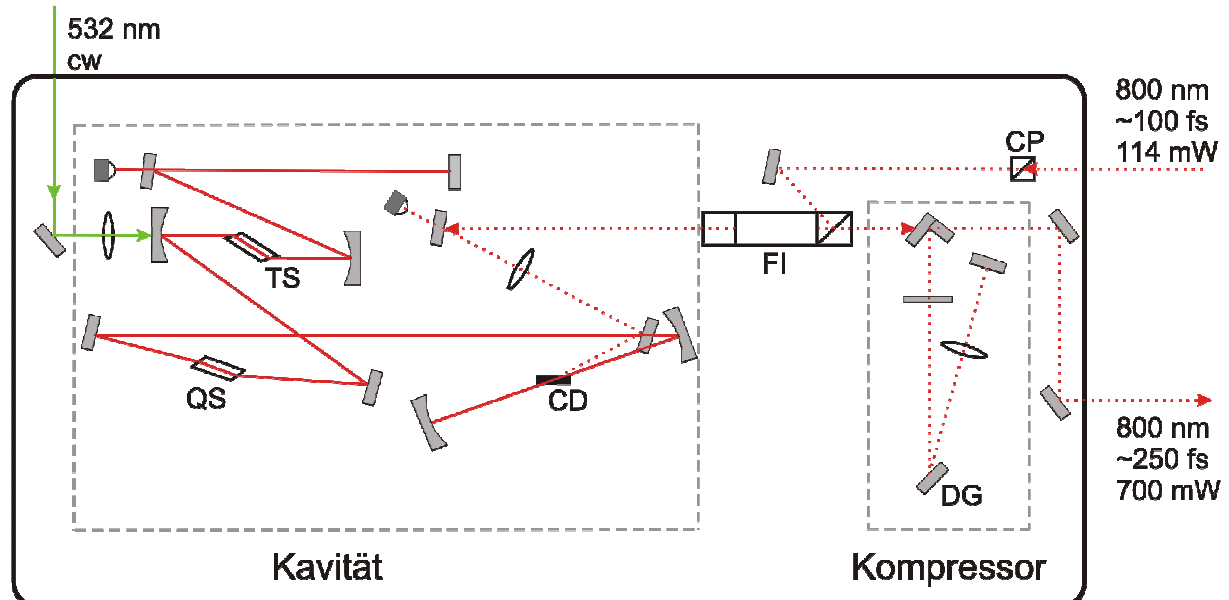


Abbildung 3 - 4: Schematischer Aufbau des RegA 9000<sup>83, 86</sup>

Das Verstärkermedium ist wieder ein Ti:Saphir Kristall, der durch den kontinuierlichen 532 nm Laserstrahl gepumpt wird. Er speichert die Energie, die nötig ist, um den eingekoppelten 800 nm Femtosekundenpuls zu verstärken, dafür muss in dem Ti:Saphir Kristall eine Besetzungsinversion aufgebaut und unerwünschtes Lasen in der Kavität verhindert werden. Dies wird durch den integrierten Q-Switch, einem akusto-optischen Modulator aus Tellurdioxid ( $\text{TeO}_2$ ) erzielt, in dem durch akustische Signale ein optisches Gitter erzeugt wird. Dies führt dazu, dass die in der Kavität vorhandenen Strahlen abgelenkt werden und es bis zum Abschalten der akustischen Signale nicht zum Lasen kommt. Nach Abschalten des Q-Switches wird über den Cavity Dumper, der ebenfalls ein akusto-optischer Modulator ist, ein Femtosekundenpuls durch Beugung in die Kavität eingekoppelt. Der Cavity Dumper besteht aus Kristallplättchen aus Tellurdioxid ( $\text{TeO}_2$ ), in denen durch einen Radiopuls die Dichte verändert wird, wodurch die transmittierenden Eigenschaften verändert werden. Nach 25 bis 30 Umläufen im Resonator und dabei jedes Mal durch den gepumpten Ti:Saphir Kristall, ist der Puls maximal verstärkt und wird durch ein zweites optoakustisches Signal an den Cavity Dumper aus der Kavität hinausgebeugt. Vor dem Durchlauf durch den Faraday Isolator wurden die vom Vitesse Duo eingehenden Femtosekundenpulse, die waagerecht polarisiert sind, an einem kubischen Polarisator um  $\lambda/2$  gedreht. Der Spiegel im

### 3 Materialien und Methoden

Farady Isolator ist für senkrecht polarisierte Strahlen reflektierend und für waagerechte Strahlung transmittierend, auf diese Weise wird verhindert, dass die durch die Kavität verstärkten Pulse den RegA in Richtung Vitesse Duo verlassen.

Die durch die Verstärkung der Femtosekundenpulse entstehende Verbreiterung (chirp) der Pulse beim Durchlaufen des Q-Switches ist ein im RegA erwünschter Effekt, da sonst Leistungsspitzen entstehen würden, die den Ti:Saphir-Kristall beschädigen oder nichtlineare optische Effekte, wie die Weißlichterzeugung, auftreten könnten. Die verstärkten Pulse sind bis zum Auskoppeln aus dem Resonator auf eine Halbwertsbreite von ca. 20 ps – 30 ps verlängert worden. Diese wellenlängenabhängige Pulsverbreiterung wird im integrierten Pulskompressor durch negative Dispersion auf ca. 250 fs komprimiert. Die Ausgangsleistung des RegA liegt bei ca 700 mW, bei einer zentralen Wellenlänge von 800 nm und einer Reptitionsrate von 120 kHz. Im RegA wurde nur jeder 640. Puls des Vitesse Duo verstärkt.

#### 3.4.3 OPA 9400<sup>82, 85, 87</sup>

Der OPA ist ein optisch-parametrischer Verstärker, durch den Pulse im Wellenlängenbereich des sichtbaren und infraroten Teil des Spektrums erzeugt werden können (Abbildung 3 - 5). Dadurch stehen unterschiedliche Anregungsenergie für Experiment an unterschiedlichsten Systemen zur Verfügung. Die im OPA ablaufenden Prozesse werden nicht elektronisch gesteuert.

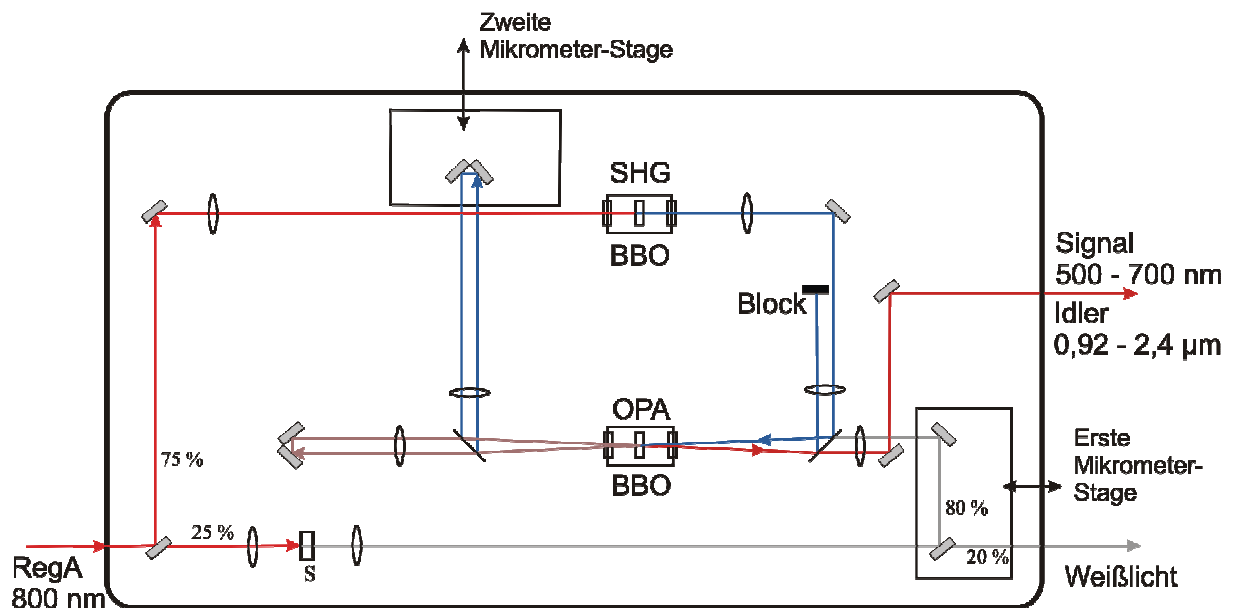


Abbildung 3 - 5: Schematischer Aufbau des OPA 9400<sup>83, 87</sup>

Der aus dem RegA kommende Puls wird im OPA durch einen Strahlteiler geteilt, dabei werden drei Viertel des Strahls durch Frequenzverdopplung zu Pulsen mit einer Wellenlänge von 400 nm und ein Viertel des eingekoppelten Pulses zur Weißlichterzeugung genutzt. Für die Weißlichterzeugung wird der Puls in ein Saphirplättchen fokussiert, dabei entsteht durch Prozesse der Selbstfokussierung und Selbstphasenmodulierung wegen der hohen fokalen Intensität und dem intensitätsabhängigen Brechungsindex von Saphir ein Puls der spektrale Anteile im Wellenlängenbereich von 460 nm – 1000 nm enthält. Durch diese Effekte werden etwas 5 % der Strahlung über den breiten Spektralbereich verschoben, das Intensitätsmaximum des Weißlichtspektrums liegt immer noch bei 800 nm, trotzdem erscheint der Puls dem menschlichen Auge als weiß. Der Weißlichtpuls besitzt einen positiven Chirp, die langwelligen Anteile des Pulses befinden sich am Beginn des Pulses, während die kurzwelligen Anteile das Ende des Pulses bilden.

### 3 Materialien und Methoden

Für die Frequenzverdopplung des eingekoppelten Laserstrahls wird der Puls mit einer Zentralwellenlänge von 800 nm in einen Beta-Barium-Borat-Kristall (BBO) fokussiert, der dadurch in ein Puls mit der Zentralwellenlänge von 400 nm umgewandelt wird.

Dieser frequenzverdopplete Puls wird mit dem Weißlichtpuls in einem zweiten BBO-Kristall überlagert und fokussiert, wobei es zur parametrischen Verstärkung kommt. Nach dem Kristall werden die Pulse durch einen dielektrischen Spiegel getrennt und mittels einer Mikrometerstage und Retroreflektoren erneut in demselben BBO-Kristall fokussiert, wo die parametrische Verstärkung ein zweites Mal erfolgt.

Bei dem Prozess, der im OPA abläuft, handelt es sich um eine iterative Differenzfrequenz-Erzeugung, bei der durch eine Kavitätsveränderung über die erste Mikrometerstage eine wählbare Frequenz des Weißlichtes (Signal) mit dem 400 nm Puls (Pump) überlagert wird, wodurch eine dritten Frequenz (Idler) erzeugt wird. Diese Idlerfrequenz ergibt sich aus der Differenz der Frequenz von Signalpuls und Pumpuls<sup>84</sup>.

$$\nu_{Idler} = \nu_{Pump} - \nu_{Signal} \quad \text{Gl. 17}$$

Diese neue Idlerfrequenz bildet mit der Pumpfrequenz wiederum über eine Differenzfrequenz-Erzeugung Licht in der Wellenlänge der Signalfrequenz:

$$\nu_{Signal} = \nu_{Pump} - \nu_{Idler} \quad \text{Gl. 18}$$

Durch diesen Prozess werden der ursprüngliche schwache Anteil der Signalfrequenz im Weißlicht und die Idlerfrequenz verstärkt, während die Pumpfrequenz verringert wird. Beim zweiten Durchgang durch den BBO-Kristall mittels der zweiten Mikrometerstage werden der Pumpuls und die schon verstärkte Signal- und Idlerpulse erneut überlagert, wobei im Idealfall ein Sättigungszustand zwischen den drei Frequenzen bewirkt wird.

Die im OPA erhaltenen Pulse der Signal- und Idlerfrequenz werden durch einen dielektrischen Spiegel von der Pumpfrequenz getrennt und aus dem OPA gekoppelt. Der abgetrennte Pumpuls wird innerhalb des OPAs geblockt. Der mögliche Wellenlängenbereich für die Signalepulse ist zwischen 500 nm und 700 nm, deshalb ergibt sich für den Idlerpuls ein Wellenlängenbereich von 0,9 µm bis 2,4 µm. Außerdem wird durch einen Strahlteiler auf der ersten Mikrometerstage 20 % des erzeugten Weißlichtes aus dem OPA gekoppelt.



### 3.4.4 Aufbau der Fluoreszenzmessungen

Für die Fluoreszenzmessungen wurde folgender Aufbau verwendet (Abbildung 3 - 6). Dabei wird dieselbe Stelle des vorher dunkeladaptierten Pflanzenblattes vom PAM und vom Zweiphotonenlaserstrahl belichtet. So kann innerhalb eines sehr kurzen Zeitabstandes an derselben Stelle der Pflanze eine Anregung der  $S_1$ -Niveaus der Carotinoide und der Chlorophylle stattfinden. Durch die Verwendung von sättigenden Lichtpulsen sowohl bei der Einphotonenanregung (one photon excitation, OPE) als auch bei der Zweiphotonenanregung (two photon excitation, TPE) können die erhaltenen Messergebnisse miteinander verglichen und Aussagen über die nicht-photochemischen Quenchingprozesse gemacht werden.

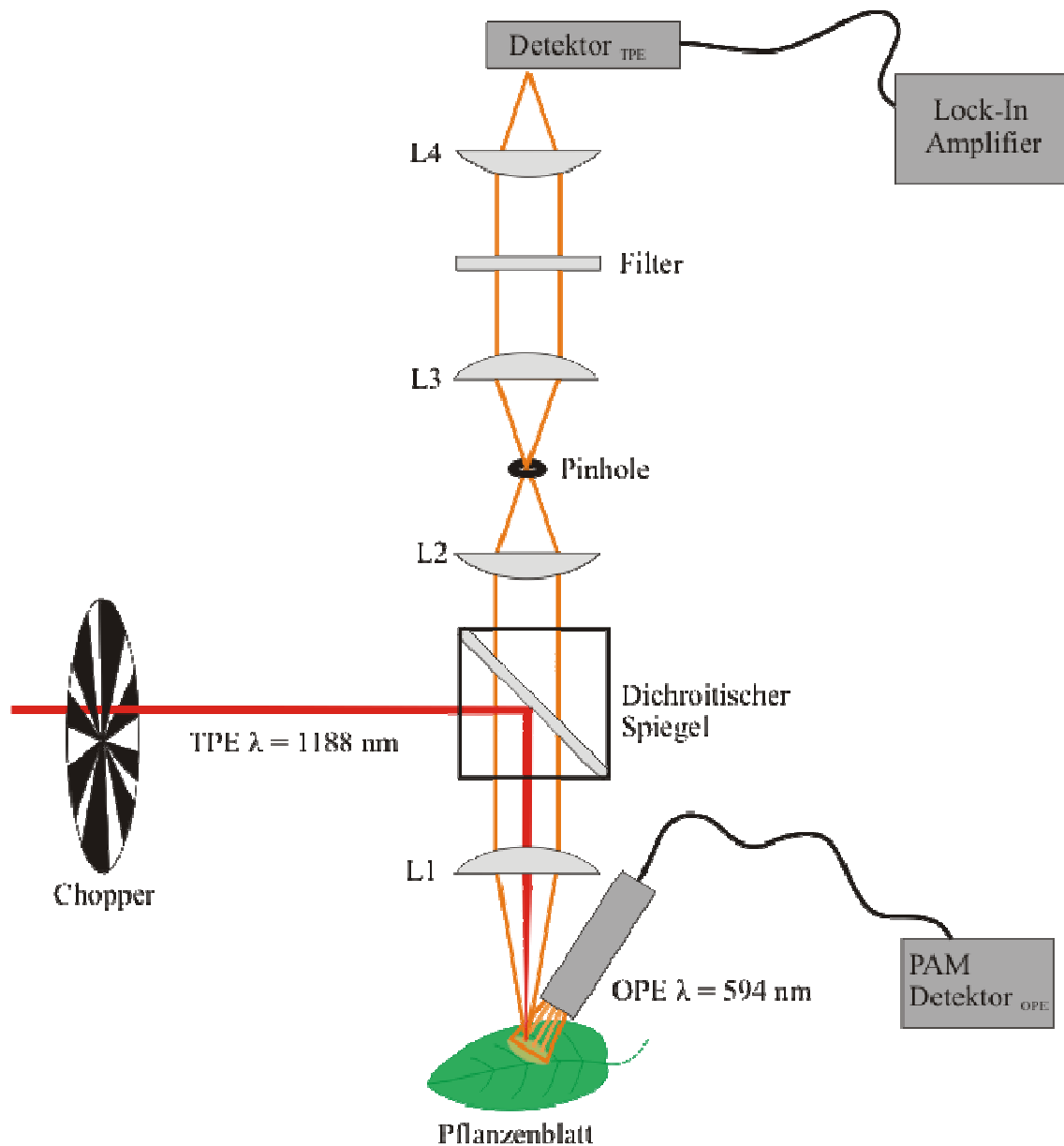


Abbildung 3 - 6: Schematischer Aufbau zur Fluoreszenzmessung durch einen konofokalen Aufbau und integriertem PAM

### 3 Materialien und Methoden

Für die Zweiphotonenanregung der Carotinoide wird der Strahl aus dem OPA ausgekoppelt, der sowohl Signalwellenlänge als auch Idlerwellenlänge, mit den Wellenlängen von  $\lambda_{\text{Signal}} \sim 603 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Idler}} \sim 1188 \text{ nm}$ , enthält. Da der aus dem OPA kommende Strahl nicht vollständig kollimiert ist, wird er durch einen Teleskopaufbau mit zwei achromatischen Linsen ( $f = 100 \text{ mm}$ ) erst fokussiert und dann wieder kollimiert. Die Trennung von Signal und Idler erfolgt durch einen Hot-Mirror (HM, Reflektion  $\sim 90 \%$ ,  $\lambda = 850 \text{ nm} - 1600 \text{ nm}$ ), der nur für infrarotes Licht reflektiv ist. Die unerwünschten Reste des sichtbaren Lichtes werden danach mit einem Cut-Off Filter (Long Pass,  $\lambda = 900 \text{ nm}$  cut-off) entfernt. Alle weiteren Spiegel des optischen Aufbaus sind hochreflektive Silberspiegel (New Focus, Reflektion  $>99\%$ ,  $\lambda = 0,45\text{-}12 \mu\text{m}$ ).

Um bei den Messungen mit unterschiedlichen Anregungsintensitäten arbeiten zu können, ist ein verstellbarer ND-Filter (*neutral density*) in den Strahlengang integriert. Zur Anregung der Probe und Detektion des Fluoreszenzlichtes wurde ein konfokaler Aufbau benutzt. Dabei wird der Idler durch einen dichroitischen Spiegel, der infrarotes Licht reflektiert durch die Linse L1 ( $f = 40 \text{ mm}$ ) auf die Probe fokussiert. Die Fluoreszenz der Probe, mit einer Wellenlänge von  $\lambda \sim 700 \text{ nm}$  wird durch dieselbe Linse L1 kollimiert und durch den dichroitischen Spiegel transmittiert. Eine weitere Linse L2 ( $f = 30 \text{ mm}$ ) fokussiert den Fluoreszenzstrahl, der durch ein  $100 \mu\text{m}$  Pinhole geführt wird, damit unerwünschtes Streulicht abgeschnitten wird und das später detektierte Fluoreszenzsignal nicht stört. Nach Kollimation durch eine weitere Linse L3 ( $f = 30 \text{ mm}$ ) wird die spektrale Wellenlänge durch einen Cut-Off Filter (Short Pass,  $\lambda = 1180 \text{ nm}$  cut-off) und einen Bandpass Filter (transmission bei  $\lambda = 700 \text{ nm} \pm 40 \text{ nm}$ ) gereinigt. Mit der Linse L4 ( $f = 25,4 \text{ mm}$ ) wird das Signal in die schnelle Photodiode (Bau und Design Prof. D. Schwarzer), die zur intensitätsabhängigen Aufnahme einzelner Frequenzen genutzt wird, fokussiert. Diese leitet das Signal der detektierten Fluoreszenz an den Lock-In-Amplifier (EG & G 5205, Dummerby, Canada) weiter, der die ankommenden Signale verstärkt. Diese Verstärkung wird durch die externe Modulation des Anregungslichtes mittels eines Choppers möglich, sie erzeugt im Lock-In-Amplifier ein Schaltsignal, das phasenstarr an die Modulation gekoppelt ist. Durch die Multiplikation des gemessenen Signals mit dem Schaltsignal kann die Amplitude des Signals aus dem Rauschen gefiltert werden. Nach Mittelung wird das so verstärkte Signal über eine Analog/Digital-Wandlerkarte (DT 304, Data Translation, Marlboro, MA, USA) in den Messrechner eingespeist. Das durch die Messungs-Software (Measure Foundry, Data Translation, Marlboro, MA, USA) erstellte Programm zeichnet die Fluoreszenzsignale gegen die Zeit auf und speichert sie als ASCII-Dateien.

### 3 Materialien und Methoden

Für die Einphotonenanregung der Chlorophylle wurde ein kommerziell erhältliches PAM System benutzt, welches so aufgebaut wurde, dass es den konfokalen Zweiphotonenaufbau nicht stört. Die Intensität des aktinschen Lichtes wurde bei der Messung auf Stufe 20, welches ca.  $350 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  entspricht, eingestellt, während der sättigende Puls bei Stufe 60 eine Intensität von ca.  $5000 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  aufweist.

Der Ablauf der Messungen mit dem PAM wurden wie in der Literatur<sup>79</sup> beschrieben durchgeführt, wobei vor jedem sättigendem Puls ein manuell gesteuerter ca. 3 Sekunden langer, ebenfalls sättigender Puls des Zweiphotonenanregungsstrahls gesetzt wurde. Während der restlichen Messung wurde das nicht benötigte Zweiphotonenanregungslicht geblockt. Die Intensität der Zweiphotonenanregung wurde während der Messungen bei ungefähr  $700 \mu\text{W}$  konstant gehalten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Durchführung der Messung

Um die ablaufenden Energietransferprozesse der Photosynthese in lebenden Pflanzen untersuchen zu können, wurde die Messung der Chlorophyll a Fluoreszenz entwickelt und wird mittlerweile als ein Standardexperiment angesehen. Sie kann mit dem kommerziell erhältlichen PAM-Fluorometern durchgeführt werden<sup>88</sup>. Die Chlorophyll a Fluoreszenz ist abhängig von der eingestrahlten Lichtintensität und ist verknüpft mit der ablaufenden Photochemie und dem nichtphotochemischen Quenching (NPQ), deshalb können durch die Messung der Fluoreszenz Aussagen über Energietransferprozesse in lebenden Pflanzen gemacht werden.

Pflanzen können schnell zwischen der Nutzung der aufgenommen Energie für photosynthetische Prozesse und der Abführung der Energie als Wärme hin und her schalten. Dieser Prozess ist auch als *molecular gear shift model* bekannt, wobei Carotinoide und dabei besonders die Xanthophylle eine große Rolle spielen. Da Carotinoide ein dunkles  $S_1$ -Niveau besitzen, können sie am besten durch Zweiphotonenanregungen untersucht werden. Deshalb wurden die Untersuchungen in dieser Arbeit an einem Aufbau durchgeführt, der sowohl die herkömmliche PAM Untersuchung als auch die neue Zweiphotonenuntersuchung vereint. Mit diesem Aufbau wurde die Chlorophyllfluoreszenz nach zwei unterschiedlichen Anregungen detektiert. Zum einen regte das PAM die Chlorophylle mit einer Wellenlänge von 594 nm an und zum anderen wurden die Carotinoide mit einer Wellenlänge von 1188 nm durch Zweiphotonenanregung angeregt. Aus dem angeregten  $S_1$ -Zustand der Carotinoide findet dann ein Energietransfer zum  $Q_y$ -Niveau der Chlorophylle statt, aus welchem die Chlorophyllfluoreszenz emittiert wird. Die Belichtung mit den beiden Anregungsstrahlen fand dabei kurz nacheinander auf derselben Stelle des Blattes statt. So konnte der Energietransfer zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen während der verschiedenen Adaptionsphasen der Pflanzen bestimmt werden. Für jede Messung wurde das Blatt zuerst für ca. 2 Sekunden mit dem Femtosekunden-Laserstrahl für die Zweiphotonenanregung belichtet. Sehr kurz danach folgt die Einphotonenanregung durch den PAM Puls. Nachdem die Fluoreszenzintensitäten, hervorgerufen durch Ein- und Zweiphotonenanregung während der aktinischen Bestrahlung

ein Plateau erreicht haben, wurde das aktinische Licht abgeschaltet und die Pflanze wieder dunkeladaptiert. Während der Dunkelphase wurden nach 2, 5, 10, und 20 Minuten weitere Ein- und Zweiphotonenanregungen durchgeführt. Die so erhaltenen Fluoreszenzintensitätsdaten nach Ein- und Zweiphotonenanregung wurden dann in einem Diagramm kombiniert dargestellt und ausgewertet.

### 4.2 Wildtyp-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*

Für die Wildtyp Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* wurde ein schnellerer Abfall der Chlorophyll a Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung ( $F^{\text{TPE}}$ ) als nach Einphotonenanregung ( $F^{\text{OPE}}$ ) erhalten (Abbildung 4 - 1, Abbildung 4 - 2 und Abbildung 4 - 3). Während der Belichtungsphase sinkt  $F^{\text{TPE}}$  schneller ab und steigt auch langsamer auf den Anfangswert während der Dunkelphase an.

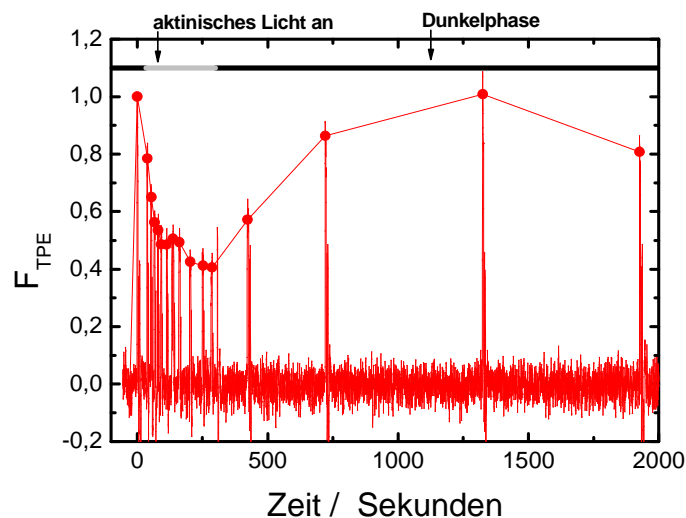


Abbildung 4 - 1: Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide

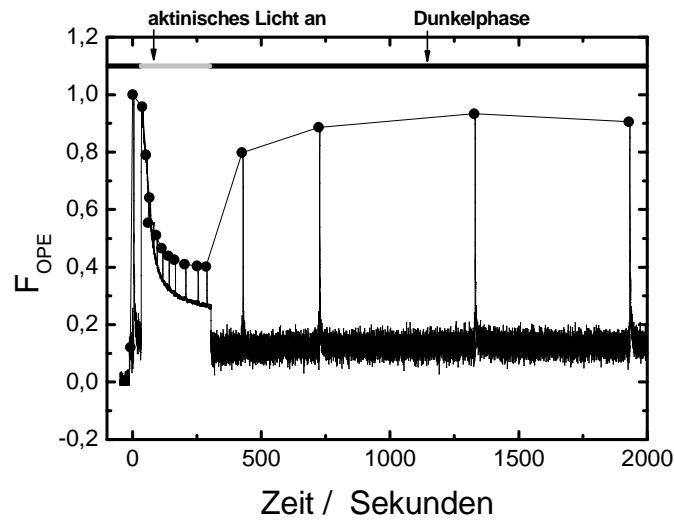


Abbildung 4 - 2: Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung der Chlorophylle

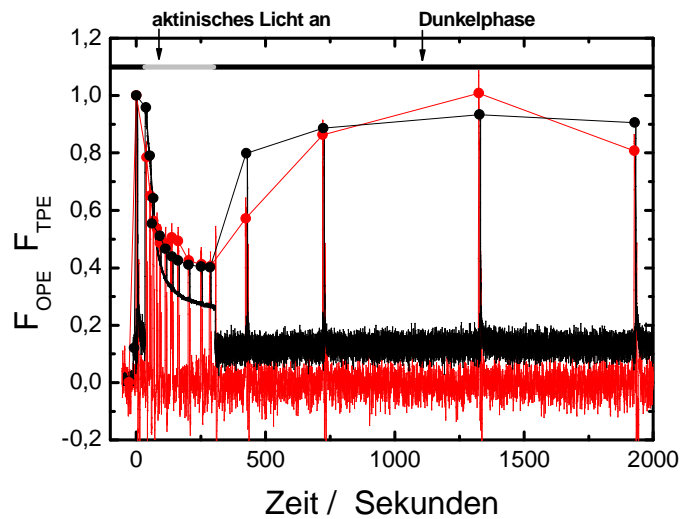


Abbildung 4 - 3: Kombiniertes Diagramm der Chlorophyllfluoreszenz nach Ein- (schwarze Kurve) und Zweiphotonenanregung (rote Kurve)

Die Einphotonenfluoreszenz ist abhängig von der Anzahl der absorbierten Photonen  $I_{abs}^{OPE}$  und der Fluoreszenz Quantenausbeute  $\Phi_{Fl}$ . Sie stellt den Anteil der Anregungsenergie der Chlorophylle dar, der nicht durch Quenching Prozesse oder photochemische Reaktionen des Reaktionszentrums abgeführt wurden.

$$F^{OPE}(t) = I_{abs}^{OPE} \cdot \Phi_{Fl}(t) \quad \text{Gl. 19}$$

## 4 Ergebnisse

Werden die Photosysteme mit sättigendem Licht bestrahlt, dann gibt  $F^{OPE}$  den Teil der Anregungsenergie wieder, der nicht durch NPQ umgesetzt wurde.

Im Gegensatz dazu ist die Chlorophyll a Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide neben der Anzahl der Photonen, die von den Carotinoiden nach Zweiphotonenanregung absorbiert wurden  $I_{abs}^{TPE}$ , außerdem noch proportional zum Anteil der Anregungsenergie  $\Phi_{Transfer}$ , der von den Carotinoiden auf die Chlorophylle übertragen wird.

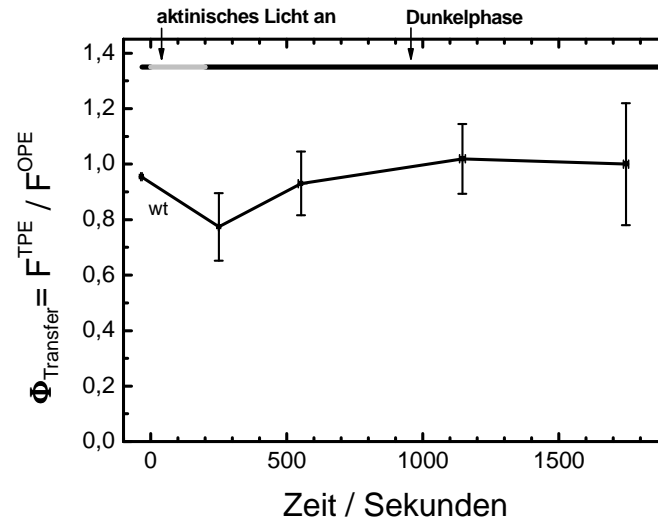
$$F^{TPE}(t) = I_{abs}^{TPE} \cdot \Phi_{Fl}(t) \cdot \Phi_{Transfer}(t) \quad \text{Gl. 20}$$

Wird der Quotient aus der absoluten Fluoreszenz nach Ein- und Zweiphotonenanregung gebildet, kann die Transfereffizienz  $\Phi_{Transfer}$  bestimmt werden.

$$\Phi_{Transfer} \propto \frac{F^{TPE}(t)}{F^{OPE}(t)} \quad \text{Gl. 21}$$

Dieser Quotient kann als Maß für den Energieübertragungsprozess von Carotinoiden auf Chlorophylle in Pflanzen dienen. Wird er während des Adaptionprozesses kleiner oder größer, verringert oder vergrößert sich die Energieübertragungsrate der Carotinoide auf die Chlorophylle. Da die Flussrichtung des Energietransfers von zwei benachbarten Molekülen nur von den relativen Energien der beteiligten Zustände abhängt<sup>89</sup>, läuft der Energiefluss bei einem kleineren  $\Phi_{Transfer}$  von den Chlorophyllen zu den Carotinoiden.

Die Transfereffizienz  $\Phi_{Transfer}$  der *wt*-Pflanzen fällt zu Beginn der helladaptierten Phase auf unter 90 % ab und steigt nach der Anpassung an das aktinische Licht bis auf ca. 10 % über dem Anfangswert an. In der Dunkelphase fällt  $\Phi_{Transfer}$  auf 80% ab, später erholt sich die Pflanze wieder völlig, da  $\Phi_{Transfer}$  wieder auf den Anfangswert ansteigt (Abbildung 4 - 4).



**Abbildung 4 - 4:** Diagramm der Transfereffizienz des Wildtyps von *Arabidopsis thaliana* im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung mit aktinischem Licht

Für Messungen, die mit dem PAM durchgeführt werden, sind mehrere Parameter definiert worden, durch die Aussagen über verschiedene Prozesse, die in Pflanzen ablaufen, getroffen werden können. Einer dieser Parameter ist der NPQ-Faktor, er wird berechnet aus der Differenz der Intensitäten des maximalen Fluoreszenzpeaks  $F_M$  im dunkeladaptierten Zustand und den Fluoreszenzpeaks aus dem helladaptierten Zustand  $F'_M$ , dividiert durch die Fluoreszenzintensität des Peaks aus dem helladaptierten Zustand  $F'_M$ .<sup>80</sup>

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} = \frac{F_M}{F'_M} - 1 \quad \text{Gl. 22}$$

Dieser NPQ-Faktor wird sowohl für die Ein- als auch für die Zweiphotonenfluoreszenz bestimmt.

Für die wt-Pflanzen ist zu erkennen, dass  $NPQ_{TPE}$  schneller ansteigt als  $NPQ_{OPE}$ , wobei der NPQ-Faktor für beide Anregungsarten nach der hell adaptierten Phase ungefähr denselben Wert zeigt. In der Dunkelphase sinkt  $NPQ_{OPE}$  schneller als  $NPQ_{TPE}$  ab, aber beide NPQ-Faktoren fallen zum Ende der Dunkelphase auf Null ab (Abbildung 4 - 5).



## 4 Ergebnisse

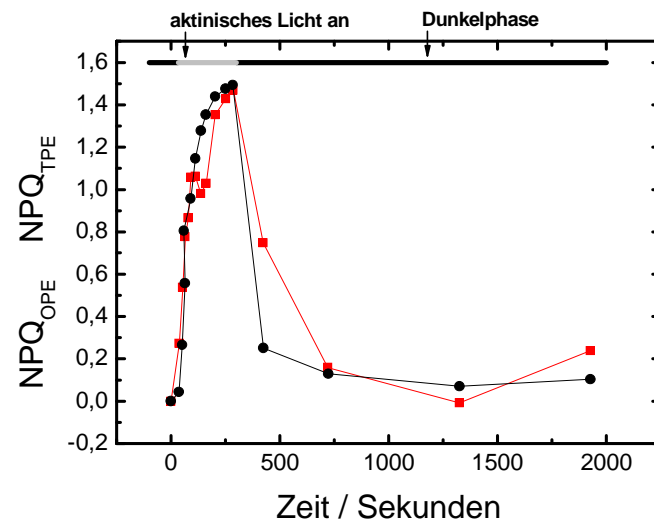


Abbildung 4 - 5: Diagramm des nicht-photochemischen Quenchingparameters für die Ein- (schwarze Kurve) und Zweiphotonenanregung (rote Kurve)

### 4.3 Xanthophyll-Zyklus Mutanten von *Arabidopsis thaliana*

Die Xanthophyll-Zyklus Mutanten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind *npq1*, in der Zeaxanthin nicht vorhanden ist, *npq2* mit einer unterdrückten Synthese von Violaxanthin und *lut2*, in der kein Lutein hergestellt wird und stattdessen ein höherer Gehalt an Violaxanthin und Antheraxanthin vorliegt.

In den folgenden Abbildungen der Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung sind nur die Maxima der Fluoreszenzpeaks nach der Belichtung durch die sättigenden Ein- bzw. Zweiphotonenanregung dargestellt. Die Fluoreszenzkurven, die durch die Belichtung mit dem aktinischen Licht entstehen wurden zur besseren Übersichtlichkeit entfernt. Auch bei der Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung ist die Grundlinie für überschaubarere Darstellung ausgeblendet worden.

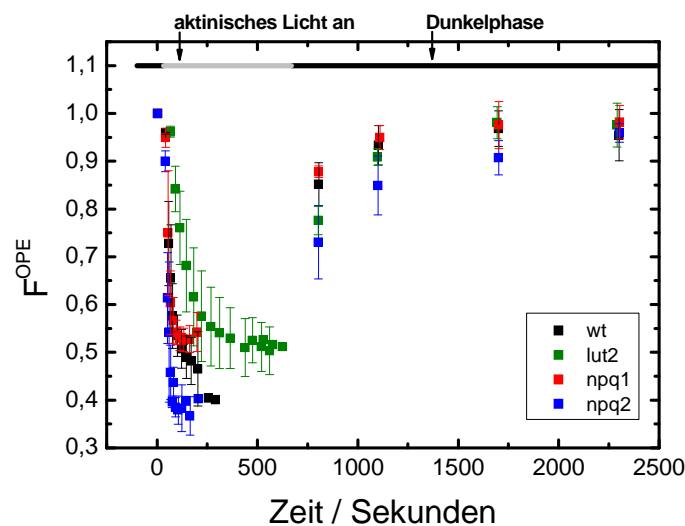
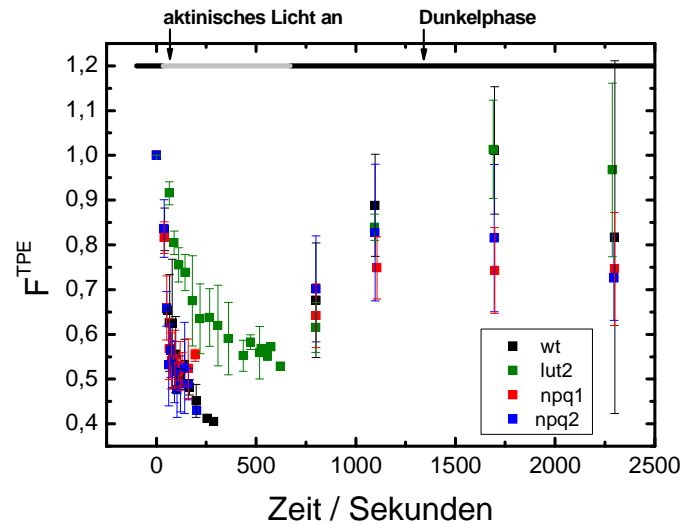


Abbildung 4 - 6: Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Xanthophyll-Mutanten



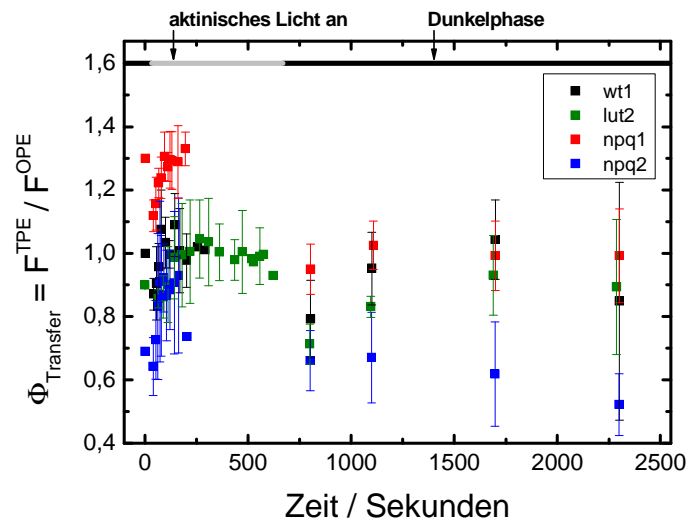
**Abbildung 4 - 7: Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Xanthophyll-Mutanten**

Für *npq1* sinkt die Zweiphotonenfluoreszenz (Abbildung 4 - 7) deutlich schneller ab als die Fluoreszenz nach Einphotonenanregung (Abbildung 4 - 6), der niedrigste Wert im helladaptierten Zustand ist aber für beide Anregungsarten ungefähr gleich. Die Einphotonenfluoreszenz steigt während der dunklen Phase schnell an und erreicht den Ausgangswert, während die Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung nicht höher als auf 75 % ansteigt.

Für *npq2*-Pflanzen sinkt in der belichteten Phase die Einphotonenfluoreszenz schneller und weiter ab als die Zweiphotonenfluoreszenz. In der Dunkelphase steigen beide Fluoreszenzen an, die OPE-Fluoreszenz regeneriert sich fast auf den Anfangswert, die TPE-Fluoreszenz dagegen steigt nur bis auf einen Wert von ca. 85 % an.

Für die *lut2*-Mutanten sinkt die OPE-Fluoreszenz auch stärker und schneller ab als die TPE-Fluoreszenz. Die Regeneration in der Dunkelphase ist für die Fluoreszenz nach Einphotonenanregung schneller, wobei sich die Pflanze für jede Anregungsart fast völlig erholt.

Die Fluoreszenzspektren für *lut2* und *npq2* haben eine ähnliche Charakteristik, d.h. das nicht Vorhandensein von Violaxanthin und Lutein führt zu einem ähnlichen Effekt.



**Abbildung 4 - 8: Abbildung der absoluten Transfereffizienz für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Xanthophyll-Mutanten**

Die absolute Transfereffizienz  $\Phi_{\text{Transfer}}$  (Abbildung 4 - 8) der *npq1*-Pflanzen fällt beim Anschalten des aktinischen Lichtes auf unter 90 % ab, durch Anpassung an die Helligkeit steigt  $\Phi_{\text{Transfer}}$  wieder an, wobei dabei der Wert von eins kaum überschritten wird. In der Dunkelphase fällt  $\Phi_{\text{Transfer}}$  auf ca. 72 % ab, die Pflanze erholt sich während der gesamten Dunkelphase nicht, da  $\Phi_{\text{Transfer}}$  nicht höher als 80 % ansteigt.

In der helladaptierten Phase der *npq2*-Mutante sinkt  $\Phi_{\text{Transfer}}$  zu Beginn kurz ab, steigt dann aber auf Werte von 35 % über dem Anfangspunkt an. In der Dunkelphase sinkt die Transfereffizienz langsam ab und erreicht nach ca. 30 Minuten den Wert von *npq1*-Mutanten. Durch die Belichtung mit aktinischem Licht fällt die Transfereffizienz von *lut2*-Mutanten kurz auf 95 % ab und bleibt danach bei ca. 10 % über dem Anfangswert konstant. In der Dunkelphase sinkt sie sehr schnell ab und ist nach einer halben Stunde Dunkeladaption auf nur ca. 90 % angestiegen.

Der Vergleich dieser Xanthophyll Mutanten zeigt, dass im hell adaptierten Zustand die Transfereffizienz für *npq2* höher ist als die für *lut2*, *npq1* hat die niedrigsten  $\Phi_{\text{Transfer}}$ -Werte. Für die Transfereffizienz scheint das Vorhandensein von Zeaxanthin ein wichtiger Faktor zu sein. Die *lut2* und *npq1* Mutanten haben einen erhöhten Gehalt an Violaxanthin, wobei in *lut2* auch Zeaxanthin akkumuliert wird, was dazu führt, dass die Transfereffizienz dabei höher ist. Im dunkeladaptierten Zustand ist die Transfereffizienz für *lut2* höher als für *npq2* und *npq1*.

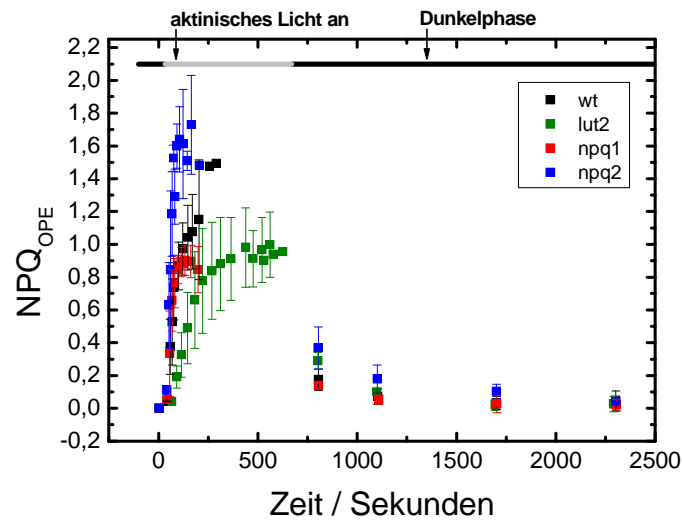


Abbildung 4 - 9: Darstellung des NPQ-Parameters nach Einphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Xanthophyll-Mutanten

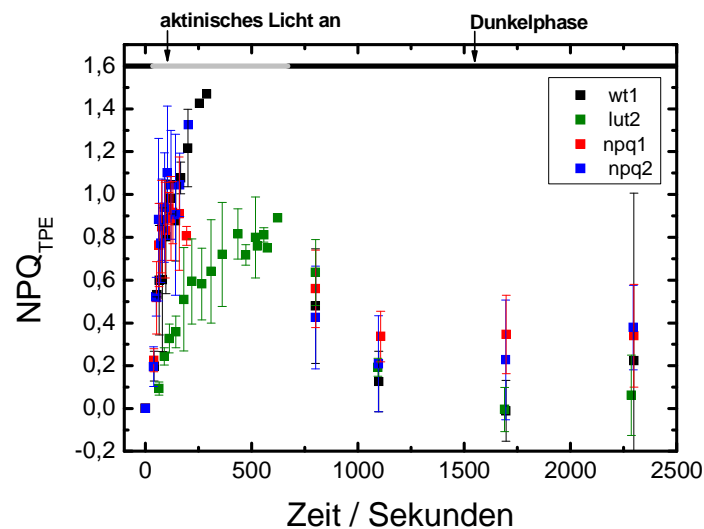


Abbildung 4 - 10: Darstellung des NPQ-Parameters nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Xanthophyll-Mutanten

Der NPQ-Faktor der *npq1*-Pflanzen steigt wieder für  $NPQ_{TPE}$  schneller an als für  $NPQ_{OPE}$  und zeigt für beide Anregungsarten in der Endphase des helladaptierten Zustandes einen ähnlichen Wert (Abbildung 4 - 9 und Abbildung 4 - 10). In der Dunkelphase sinkt  $NPQ_{OPE}$  schnell bis auf Null ab, wogegen  $NPQ_{TPE}$  nur auf 0,3 relaxiert.

#### 4 Ergebnisse

Die NPQ-Faktoren für die *npq2*-Mutante steigen im Vergleich mit den anderen Xanthophyll-Mutanten am stärksten an. Im hell adaptierten Zustand steigt NPQ<sub>OPE</sub> sehr schnell auf einen höheren Wert als NPQ<sub>TPE</sub> an. In der Dunkelphase fallen beide NPQ-Faktoren bis fast auf Anfangsniveau ab.

Die *lut2*-Mutante zeigt von den relativen Werten eine ähnliche Charakteristik wie die Mutante, die kein Zeaxanthin enthält, wobei aber der Anstieg sehr viel langsamer abläuft. Beide NPQ-Faktoren steigen in der Belichtungsphase gleich schnell auf ähnliche Maximalwerte an, während im dunkeladaptierten Zustand sowohl NPQ<sub>TPE</sub> und NPQ<sub>OPE</sub> sehr schnell auf Werte um Null abfallen.

Der Vergleich der NPQ-Faktoren der Xanthophyll-Mutanten zeigt, dass sowohl für NPQ<sub>OPE</sub> als auch für NPQ<sub>TPE</sub> die *npq2*-Mutante im hell adaptierten Zustand die höchsten NPQ-Werte annimmt, während *lut2* und *npq1* kleiner Werte zeigen. In der Dunkelphase zeigt *lut2* für beide Faktoren die niedrigsten Werte.

#### 4.4 Mutanten von *Arabidopsis thaliana* mit verändertem Gehalt an PsbS

Die *npq4*-Mutanten, die in dieser Arbeit vermessen wurden, können kein PsbS synthetisieren, da das entsprechende Gen nicht mehr im Genom vorliegt. In die *wt+PsbS* Pflanzen wurde ein Promoter vor das PsbS-Gen eingefügt, um so die Konzentration von PsbS in der Pflanze zu erhöhen.

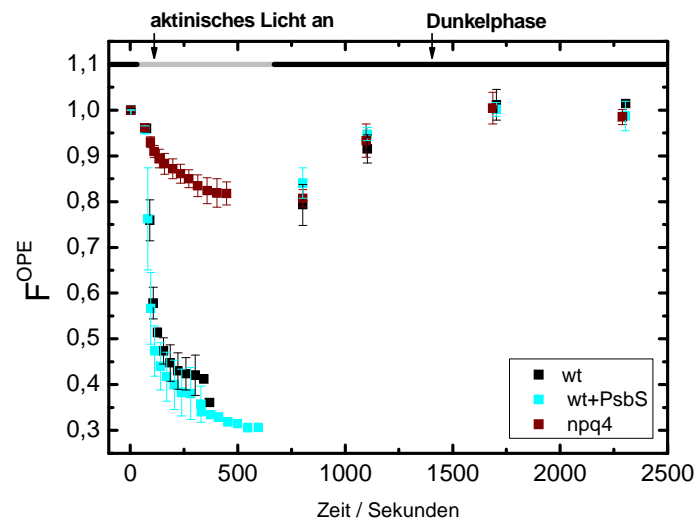


Abbildung 4 - 11: Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt

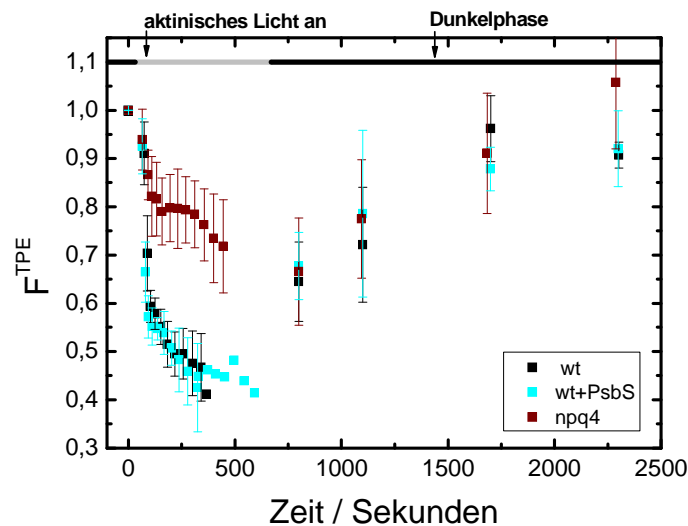
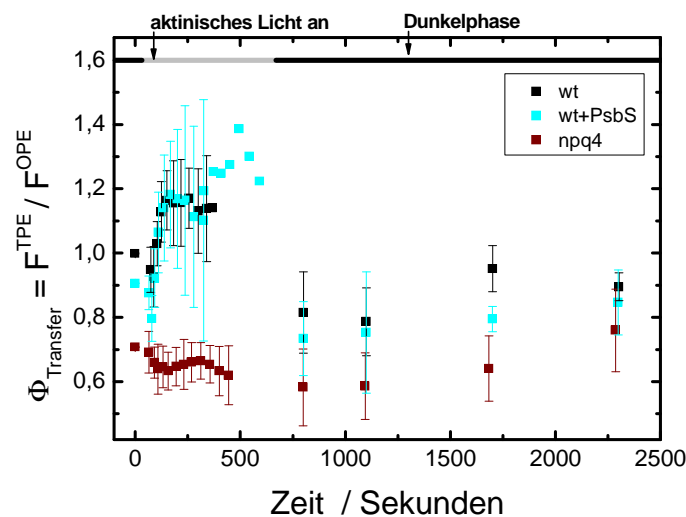


Abbildung 4 - 12: Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt

Die Fluoreszenz nach Einphotonenanregung (Abbildung 4 - 11) sinkt bei *npq4* langsamer und nicht so stark ab, wie die Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung (Abbildung 4 - 12). In der dunkeladaptierten Phase steigt die Zweiphotonenfluoreszenz schneller an als die Einphotonenfluoreszenz, wobei aber beide Fluoreszenzen auf das Anfangslevel ansteigen. Für *wt+PsbS* sinkt dagegen im hell adaptierten Zustand die Fluoreszenz nach Einphotonenanregung schneller und stärker als die nach Zweiphotonenanregung. In der Dunkelphase steigt die Fluoreszenz der Zweiphotonenanregung langsamer an als die der Einphotonenanregung, beide kommen auf mehr als 90 % des Anfangswertes.

Generell ist zu Erkennen, dass die Fluoreszenzen bei den *wt+PsbS* Mutanten sehr viel stärker abnehmen in der helladaptierten Phase als bei den *npq4* Pflanzen. PsbS ist für das Auftreten von Quenching nötig.



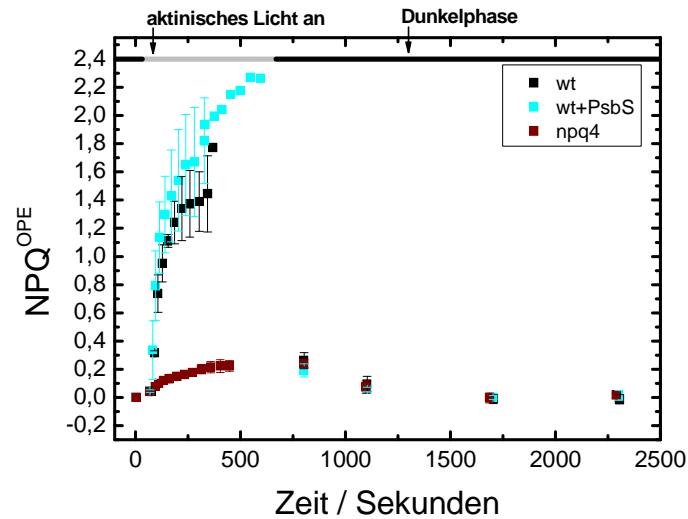
**Abbildung 4 - 13: Darstellung der absoluten Transfereffizienz für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt**

Die Transfereffizienzen  $\Phi_{\text{Transfer}}$  unterscheiden sich sehr stark für die beiden Proben (Abbildung 4 - 13). Das vermehrte Vorhandensein von PsbS führt in der belichteten Phase erst zu einem kurzen Abfall der Transfereffizienz, sie steigt aber danach auf über 60 % des Anfangswertes an. Zu Beginn der Dunkelphase fällt  $\Phi_{\text{Transfer}}$  stark ab und steigt dann wieder auf den Anfangswert an. Die Transfereffizienz der *npq4*-Pflanzen sinkt zu Beginn der hell adaptierten Phase genauso weit ab wie bei den *wt+PsbS*-Pflanzen, aber der darauffolgende Anstieg ist nur gering. In der Dunkelphase steigt die  $\Phi_{\text{Transfer}}$  wieder auf den Anfangswert an.

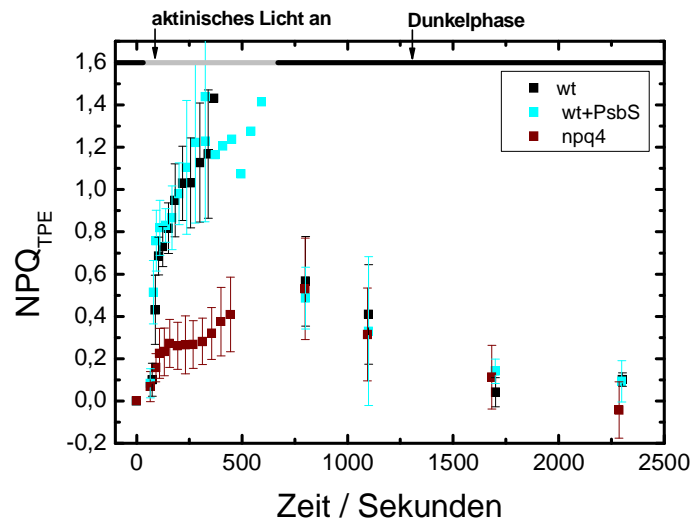


## 4 Ergebnisse

Auch in dieser Auftragsung ist zu erkennen, dass PsbS eine entscheidende Rolle bei der Energieverteilung in Pflanzen spielt.



**Abbildung 4 - 14:** Darstellung der NPQ-Parameter nach Einphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt



**Abbildung 4 - 15:** Darstellung der NPQ-Parameter nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt

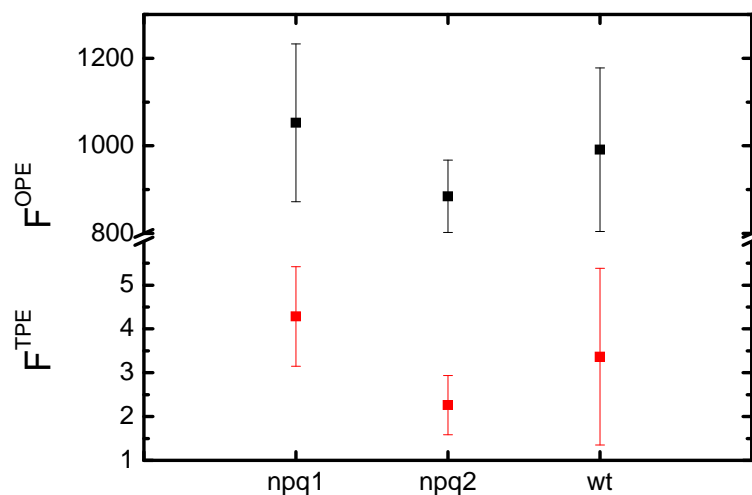
Die Quenching-Faktor  $NPQ_{TPE}$  und  $NPQ_{OPE}$  (Abbildung 4 - 14 und Abbildung 4 - 15) spiegeln auch die Ergebnisse der obigen Diagramme wider. Sowohl  $NPQ_{TPE}$  als auch  $NPQ_{OPE}$

von *wt+PsbS* Mutanten steigen während der aktinischen Belichtung auf sehr hohe Werte an und fallen in der Dunkelphase wieder sehr schnell ab. Für die *npq4*-Pflanzen ist bei beiden Quenching-Faktoren nur ein geringer Anstieg während der Adaption an Licht zu beobachten, während der Dunkeladaption fallen diese auch wieder ab. Mit diesen beiden Mutanten sind bei jeder Betrachtung erhebliche Unterschiede festzustellen, die eindeutig zeigen, dass das Vorhandensein von PsbS ein wichtiger Faktor für das Quenchen der überschüssigen Energie in Pflanzen ist.

#### 4.5 Absolute Fluoreszenzintensitäten der Messungen nach Ein- oder Zweiphotonenanregung

Die absoluten Fluoreszenzintensitäten nach der Ein- oder Zweiphotonenanregung zeigen ähnliche Trends (Abbildung 4 - 16 und Abbildung 4 - 17).

Die Xantophyll-Mutanten, *npq2* und *lut2* zeigen geringere Intensitäten als die *wt*-Pflanzen, während *npq1* eine höhere Intensität hat.

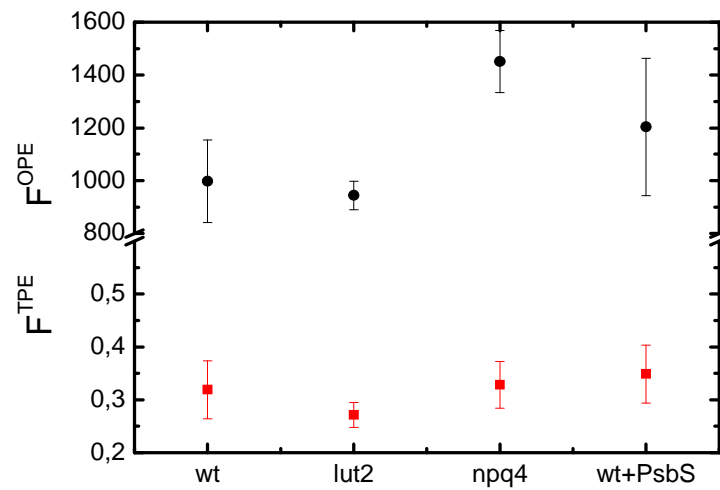


**Abbildung 4 - 16:** Absolute Fluoreszenzintensitäten der Ein- (schwarze Punkte) und Zweiphotonenanregung (rote Punkte) für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und *npq1*- und *npq2*-Mutanten

Dagegen zeigen die PsbS angereicherte und auch die Mutante ohne PsbS eine sehr viel größere Fluoreszenzintensität bei Einphotonenanregung als Wildtyp-Pflanzen. Für die

#### 4 Ergebnisse

Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung zeigt sich bei der mit PsbS angereicherten Mutante eine höhere Fluoreszenz als für *wt*, für *npq4* ist die Fluoreszenz allerdings geringer als die des Wildtyps.



**Abbildung 4 - 17:** Absolute Fluoreszenzintensitäten der Ein- (schwarze Punkte) und Zweiphotonenanregung (rote Punkte) für Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und *npq4*-, *lut2*- und *wt+PsbS*-Mutanten

## 5 Diskussion

Gegenwärtig existieren verschiedene Modelle, mit denen der Mechanismus des nicht-photochemischen Quenchens beschrieben wird. Diese Modelle erklären den Schutzmechanismus als Änderung der Konformation der Lichtsammelkomplexe, die Bildung eines Quencher-Moleküls oder die Absenkung von Energieniveaus, was zur Veränderung des Energietransfers führt. Im folgenden Kapitel werden die zurzeit diskutierten Modelle vorgestellt und die von uns erhaltenen Daten mit den bestehenden Modellen in Zusammenhang gebracht.

### 5.1 Modelle zur Erklärung von nicht photochemischem Quenching

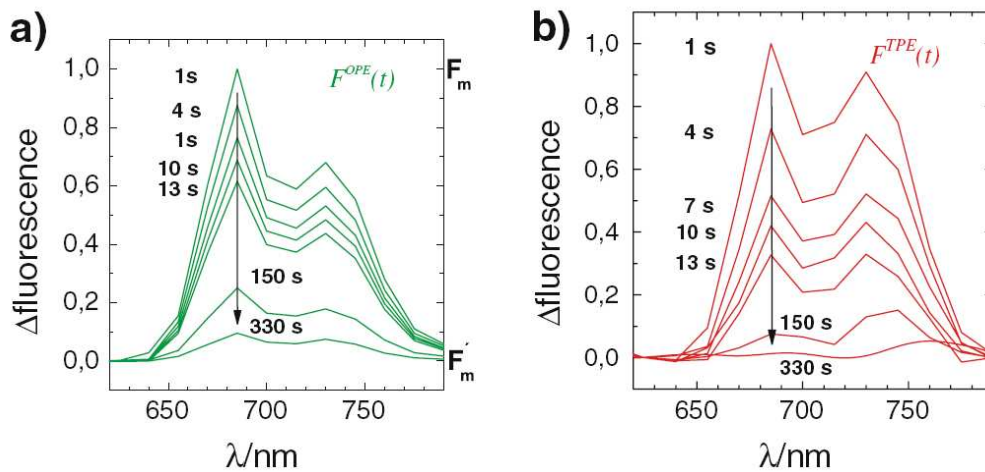
Der Xanthophyll-Zyklus und dabei vor allem das Carotinoid Zeaxanthin spielen beim nicht-photochemischen Quenchen des LHCII eine wichtige Rolle. Diese Funktion des Zeaxanthins ist mittlerweile allgemein akzeptiert.<sup>88</sup> Dabei aktiviert der durch Licht gebildete pH-Gradient das VDE-Enzym und aus Violaxanthin wird Zeaxanthin gebildet. Durch den niedrigen pH-Wert im Lumen wird außerdem PsbS, die Untereinheit des PSII protoniert.<sup>59, 90</sup> PsbS ist notwendig für einen funktionierenden Quenchingmechanismus *in vivo*.<sup>53</sup> Untersuchungen, die Hinweise auf den Mechanismus und die Rollen von Zeaxanthin und PsbS liefern sind notwendig, um nicht-photochemisches Quenchen zu verstehen.

Beim *molecular gear shift model*<sup>24, 25, 40, 91</sup> wird das Abführen der überschüssigen Energie mit den Umwandlungen, die im Xanthophyll-Zyklus ablaufen in Verbindung gebracht. Dieses Modell beschreibt die enzymatische Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin, die durch den während der Lichtreaktion entstandenen pH-Gradienten getriggert wird und den dadurch veränderten Energietransfer zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen. Beim Vorliegen von Violaxanthin in der Pflanze wird Energie über das S<sub>1</sub>-Niveau in das Q<sub>y</sub>-Niveau der Chlorophylle transferiert und von dort an die Reaktionszentren weitergeleitet. Durch die Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin wird das S<sub>1</sub>-Niveau des Zeaxanthins durch die Vergrößerung des konjugierten  $\pi$ -System abgesenkt. Deshalb kann keine Energie vom S<sub>1</sub>-Zustand von Zeaxanthin zum Q<sub>y</sub>-Niveau der Chlorophylle transferiert werden, sondern

überschüssige Energie der Chlorophylle kann an den  $S_1$ -Zustand des Zeaxanthin abgegeben werden. Diese überschüssige Energie kann dann als Wärme aus der Pflanze abgeführt werden. Um diesen Mechanismus genauer zu untersuchen wurden von Wehling *et al.*<sup>25</sup> kombinierte Ein- und Zweiphotonenuntersuchungen durchgeführt. Da der  $S_1$ -Zustand der Carotinoide auf Grund von Auswahlregeln optisch verboten ist, ist es schwierig diesen Zustand direkt zu untersuchen, um so das *molecular gear shift model* zu bestätigen oder widerlegen. Durch Zweiphotonenanregung der Carotinoide kann aber wegen der Umkehr der Auswahlregeln das  $S_1$ -Niveau der Carotinoide selektiv angeregt werden. Mittels der Kombination von gleichzeitiger Einphotonenanregung der Chlorophylle und Zweiphotonenanregung der Carotinoide mit jeweiliger Detektion der Chlorophyllfluoreszenz kann daher das *molecular gear shift model* untersucht werden. Wird die beobachtbare Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide dividiert durch die beobachtbare Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung der Chlorophylle, kann die Transfereffizienz bestimmt werden. Wird diese während des Adaptionsprozesses der vermessenen Pflanze kleiner oder größer deutet dies auf eine Veränderung des Energietransfers zwischen Carotinoiden und Chlorophyllen hin.

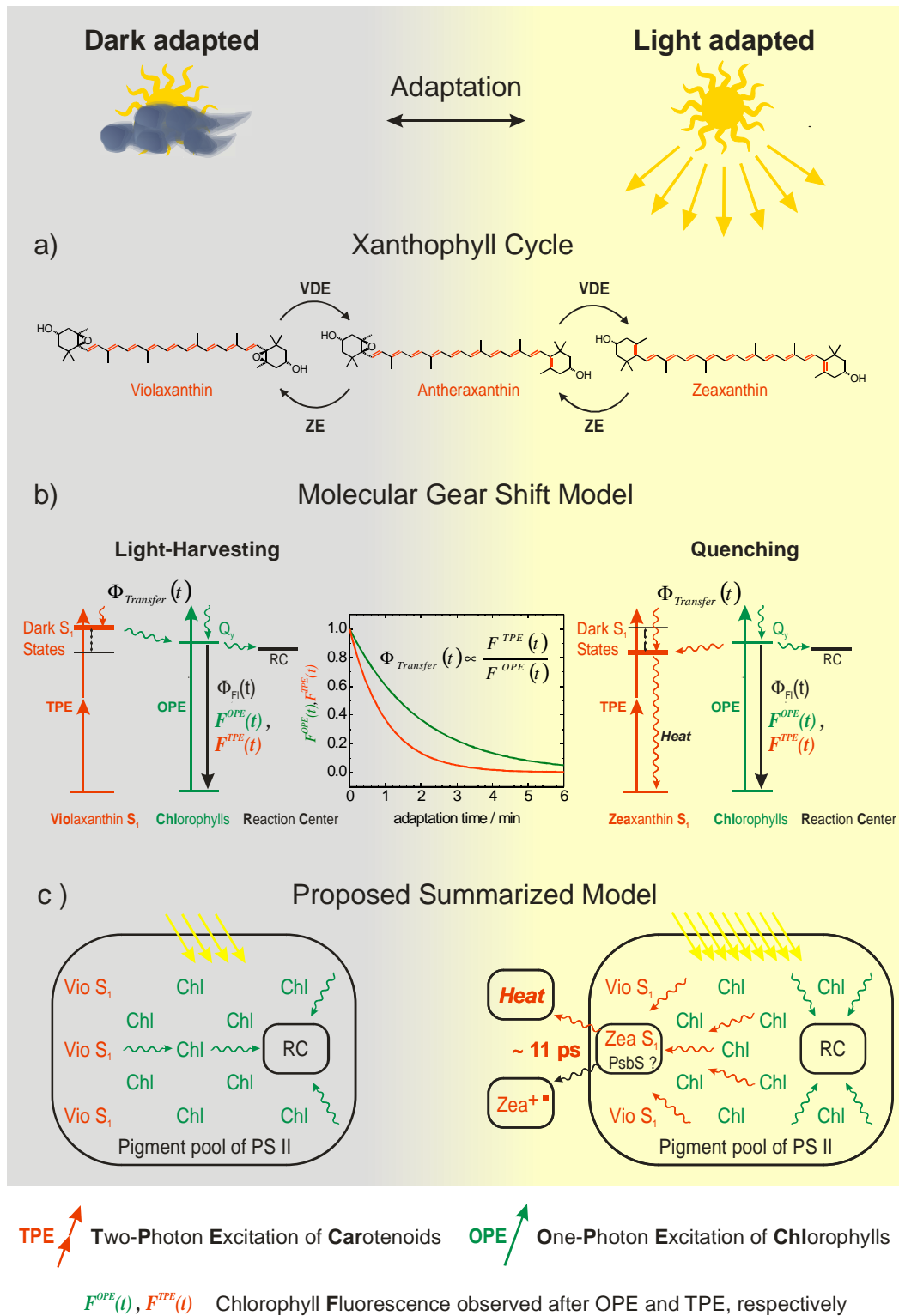
Für diese Untersuchungen wurden dunkeladaptierte Pflanzen an der gleichen Stelle abwechselnd mit Licht der Einphotonenanregung der Wellenlänge  $\lambda = 575$  nm oder mit Licht der Zweiphotonenanregung der Wellenlänge  $\lambda = 1150$  nm bestrahlt und die daraus resultierende Chlorophyllfluoreszenz detektiert. Dabei wird die Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung vor allem durch die Carotinoide unterstützt, die eine hohe Energieübertragung an Chlorophylle leisten. Diese sind vor allem Carotinoide, die nicht mehr als 9 konjugierte Doppelbindungen besitzen. Falls das *molecular gear shift model* nicht zum nicht-photochemischen Quenchen beiträgt, sollte keine Änderung der ermittelten Transfereffizienz während der Adaption der Pflanze beobachtet werden. Die Ergebnisse des Experiments zeigen dagegen eine signifikante Änderung der Transfereffizienz während der Lichtadaption der Pflanze. Dies kann erklärt werden durch die Annahme, dass ein großer Teil der Carotinoide, die im Anfangszustand Energie transferieren, wie zum Beispiel Violaxanthin im PSII, keine Energie im helladaptierten Zustand weiterleiten und das außerdem die restlichen Carotinoide, wie  $\beta$ -Carotin im PSI andauernd nur einen kleinen Betrag an Energie transferieren. Diese Annahme wird durch die spektrale Abhängigkeit der Änderung der Transfereffizienz gestützt, die größer ist bei 635 nm als bei 730 nm. Dieses Ergebnis bestätigt,

dass die Quenching-Stelle eher im PSII Pigment-Protein-Komplexe zu finden ist (Abbildung 5 - 1).<sup>25</sup>



**Abbildung 5 - 1: Fluoreszenzspektren von dunkeladaptierten Schilfblättern a) Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung der Chlorophylle und b) Fluoreszenzspektren nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide<sup>25</sup> (Abdruck nach Genehmigung von Springer Science + Business Media: Photosynthesis Research, copyright 2007, Lizenznummer: 1985831265165, Lizenzvertrag siehe Anhang)**

Sinkt bei einer kombinierten Ein- und Zweiphotonenanregung eines Pflanzenblattes während der Helladaption die Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung stärker ab als die nach Einphotonenanregung, ist dies ein Hinweis auf die Beteiligung des Xanthophyll-Zyklus beim Quenchen von überschüssiger Energie. Schon ein einziges Zeaxanthin-Molekül kann ausreichend sein, um überschüssige Energie als Wärme aus den Pflanzen abzuführen, wodurch trotz langsamer Aktivierung des Enzyms das sofortige Quenchen bei andauernder Belichtung erklärt werden kann.<sup>25</sup> Außerdem kann aus dem entstandenen Zeaxanthin-Molekül auch ein Zeaxanthin-Radikalkation<sup>92, 93</sup> gebildet werden, das die überschüssige Energie abführt. Des Weiteren wäre auch eine Einbindung von PsbS in diesem Mechanismus möglich. (Abbildung 5 - 2). Die Ergebnisse von Wehling *et al*<sup>25</sup> unterstützen also das Vorliegen des *molecular gear shift model* und dessen Beteiligung am nicht-photochemischen Quenchen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Möglichkeit eines *molecular gear shift model* genauer ermittelt werden, indem die Transfereffizienzen auch für den helladaptierten Zustand gemessen und verschiedene Pflanzenmutanten untersucht wurden.



**Abbildung 5 - 2: Molecular Gear Shift Modell<sup>25</sup>** (Abdruck nach Genehmigung von Springer Science + Business Media: Photosynthesis Research, copyright 2007, Lizenznummer: 1985831265165, Lizenzvertrag siehe Anhang)

## 5 Diskussion

Die Funktion des Zeaxanthins beim Energie-abhängigen Quenchen wurde mit verschiedenen weiteren in der Literatur beschriebenen Experimenten untersucht.

Ma *et al.*<sup>28</sup> führte transiente Absorptionsmessungen (TA) an intakten und aktiven Thylakoidmembranen von Spinat und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen durch. Dabei wurde die  $Q_y$ -Bande der Chlorophylle selektiv bei 683 nm oder 664 nm angeregt. Die Detektion fand in zwei verschiedenen Bereichen statt, entweder bei 530 nm bis 580 nm als eine transiente Absorption vom  $S_1$ -Niveaus zum  $S_n$ -Niveau von Zeaxanthin oder bei 650 nm bis 720 nm für die stimulierte Emission der  $Q_y$ -Bande der Chlorophylle.

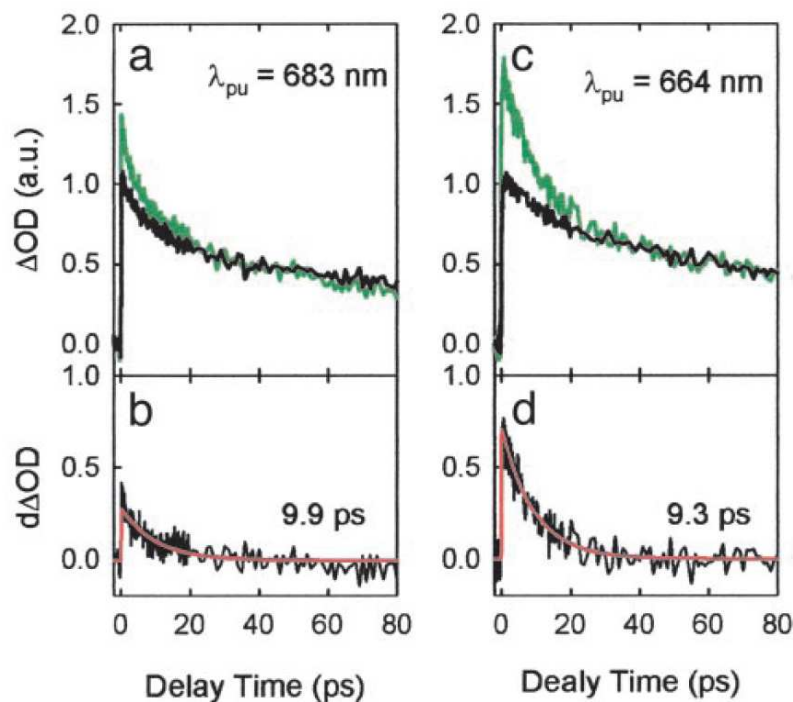


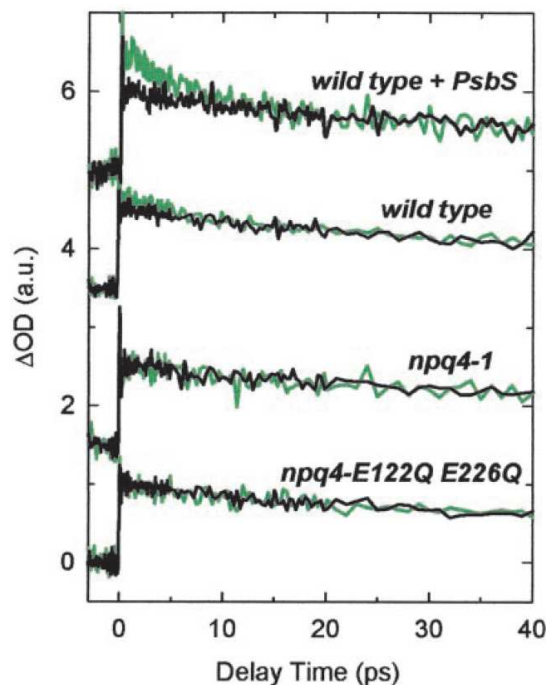
Abbildung 5 - 3: a und c: Die transiente Absorptionskinetiken im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen. b und d: Differenz Kurve aus belichteten und unbelichtetem Zustand mit jeweiligem monoexponentielle Fit (rote Kurve) und den entsprechenden Lebensdauern.<sup>28</sup> (Copyright 2003, National Academy of Sciences, U.S.A. Lizenzklärung siehe Anhang)

Da sowohl Wildtyp Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* als auch Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt oder veränderter Xanthophyll-Zusammensetzung vermessen wurden, können Rückschlüsse auf die Rolle von PsbS, Zeaxanthin und Lutein für qE gezogen werden. Die transiente Absorptionsmessungen wurden bei allen Proben in zwei Zuständen ausgeführt, die eine Konstellation in dem kein qE existiert, also der dunkeladaptierte Zustand und die andere Konstellation mit maximalem qE, der durch die konstante Belichtung der Probe herbeigeführt



wird. Dabei zeigten die Messungen von Spinat-Thylakoiden im belichteten Zustand einen schneller Anfangsabfall und eine kleinere Anfangsamplitude als der unbelichtete Zustand (Abbildung 5 - 3).

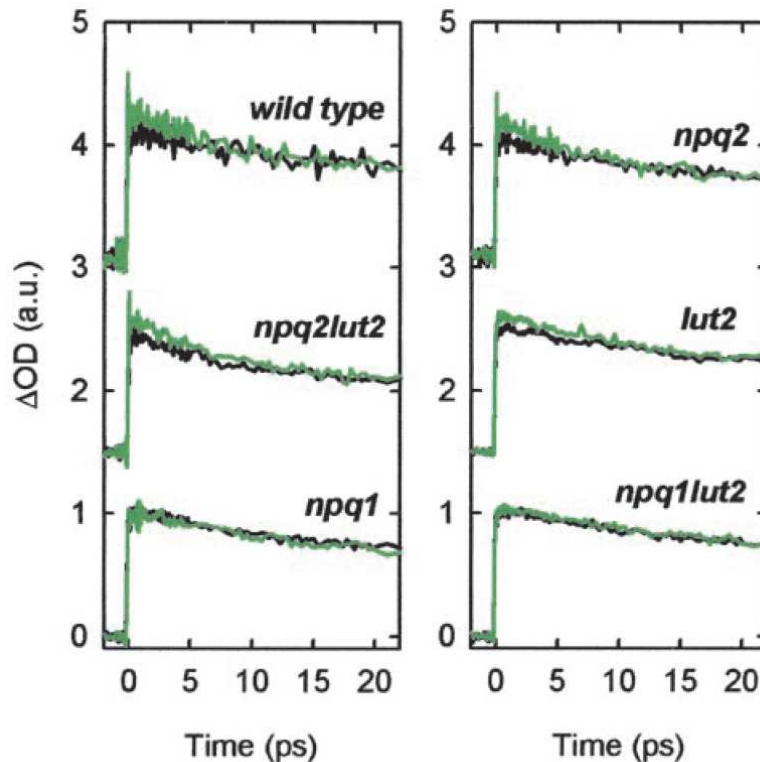
Berechnungen für die verschiedenen TA-Profile und eine allgemeine Lebensdaueranalyse der erhaltenen Signale führt zu der Annahme, dass im unbelichteten Zustand das beobachtete Signal nach der Anregung des Chlorophyll  $Q_y$ -Niveaus durch eine Absorption des angeregten Zustands der Chlorophylle entsteht. Für den belichteten Zustand dagegen wird ein überlagerndes Signal von einem zusätzlichen, nicht zu den Chlorophyll-Energieniveaus gehörendem Übergang, detektiert.



**Abbildung 5 - 4:** Die skalierten transiente Absorptionskinetiken von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand.<sup>28</sup> (Copyright 2003, National Academy of Sciences, U.S.A. Lizenzklärung siehe Anhang)

Bei den Messungen der Thylakoide von *Arabidopsis*-Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt zeigte sich im belichteten und unbelichteten Zustand ein großer Unterschied der erhaltenen Kurven bei einem erhöhten PsbS-Gehalt und ein etwas kleinere Unterschied für die Thylakoide aus den *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen (Abbildung 5 - 4). Die Thylakoide aus *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit verringertem PsbS-Gehalt oder inaktivem PsbS zeigten keinen Unterschied für die beiden Belichtungszustände.

Des Weiteren zeigte sich bei den transienten Absorptionsmessungen der Thylakoide von *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit veränderter Zusammensetzung der Xanthophylle, dass unterschiedliche Kurven für die beiden Belichtungszustände nur dann erhalten werden, wenn Zeaxanthin in den Thylakoiden vorhanden ist (Abbildung 5 - 5). Bei dem Fehlen von Zeaxanthin konnten keine Unterschiede in den Kurven bei belichtetem und unbelichtetem Zustand festgestellt werden.

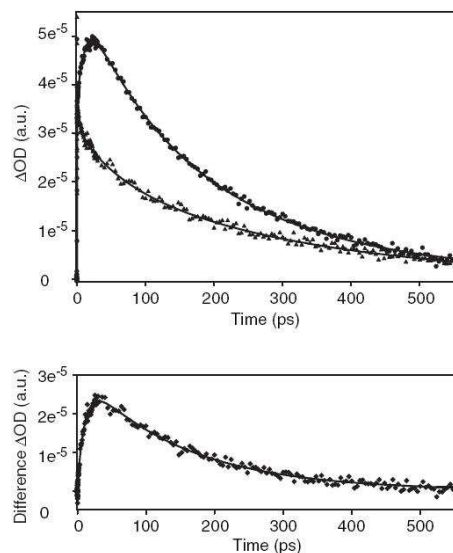


**Abbildung 5 - 5:** Die skalierten transienten Absorptionskinetiken von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und Mutanten mit veränderter Xanthophyll-Zusammensetzung im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand. <sup>28</sup> (Copyright 2003, National Academy of Sciences, U.S.A. Lizenzklärung siehe Anhang)

Die kinetischen Unterschiede treten also nur auf, wenn sowohl qE als auch Zeaxanthin vorhanden sind. Folglich entstehen die unterschiedlichen Kinetiken bei den verschiedenen Belichtungen durch das Entstehen eines pH-Gradienten, die Bildung von Zeaxanthin und das Vorhandensein von PsbS. Zur Identifikation der Spezies der schnellen Anfangskinetik im belichteten Zustand wird die Lebensdauer gefittet. Daraus ergibt sich eine Lebensdauer von sieben bis elf Picosekunden. Da die  $S_1$ -Lebensdauer von Zeaxanthin ca. neun Pikosekunden beträgt, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses  $S_1$ -Niveau den Messergebnissen zugeordnet werden kann. Die Abklingprofile stammen im belichteten Zustand durch die Absorption eines

angeregten Zustands, sie entstehen durch das Auftreten eines Übergangs vom  $S_1$ -Energieniveau zu einem höheren  $S_n$ -Energieniveau der Xanthophylle. Die möglichen Mechanismen für die Bildung von angeregten Zuständen von Zeaxanthin unter Belichtung kann ein Energietransfer von den Chlorophyllen zu dem  $S_1$ -Niveau von Zeaxanthin sein oder die Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll Heterodimers. Der entstehende Energietransfer von Chlorophyllen zu Zeaxanthin muss dabei so schnell sein, dass er mit dem Energietransfer von einem Chlorophyll zu einem anderen mithalten kann. Außerdem muss der Rücktransfer von Zeaxanthin zu Chlorophyllen unterbunden sein. Die Berechnung der Wechselwirkungen des Xanthophyll-Chlorophyll Heterodimers zeigt kaum einen Einfluss auf die Lebensdauer des angeregten Zustands  $S_1$  von Zeaxanthin. Die durch diese Messung gewonnen Ergebnisse deuten auf das Entstehen eines Quenchers hin, der entweder durch das  $S_1$ - Niveau von Zeaxanthin oder die Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll Heterodimer erklärt werden kann.<sup>28</sup>

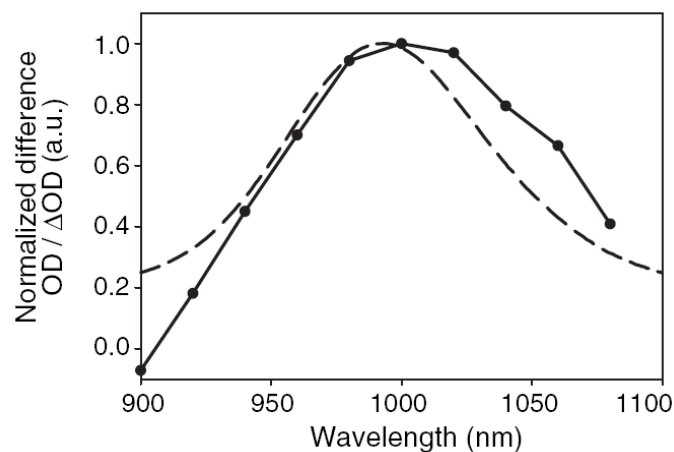
Außerdem wurden von Holt *et al.*<sup>92</sup> weitere transiente Absorptionsmessungen von intakten, aktiven Thylakoiden von Spinatpflanzen oder Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, aber diesmaliger Aufnahme der entstehenden Kinetiken in der Region von 900 nm bis 1080 nm, in der Carotinoid-Radikalkationen absorbieren, durchgeführt.



**Abbildung 5 - 6:** oben: Transiente Absorptionsdaten von Spinat Thylakoiden im belichteten (Kreise) und unbelichteten (Dreiecke) Zustand mit den jeweiligen Fits. unten: Kurve aus der Differenz von belichtetem und unbelichtetem Zustand mit zugehörigem Fit.<sup>92</sup> (From Nancy E. Holt *et al.*, SCIENCE 307:433-436 (21 January 2005). Reprinted with permission from AAAS. Referenznummer: 08-26770, Permission Letter siehe Anhang)

Dabei wurde im belichteten Zustand eine zusätzliche Anstiegs- und Abklingkomponente im Vergleich zum unbelichteten Zustand beobachtet (Abbildung 5 - 6). Durch Subtraktion der erhaltenen Kinetik im unbelichteten Zustand von der Kinetik mit Belichtung, ergibt sich eine Kurve, die eine Anstiegskomponente von ca. elf Pikosekunden und eine Abklingkomponente von ca. 150 Pikosekunden enthält.

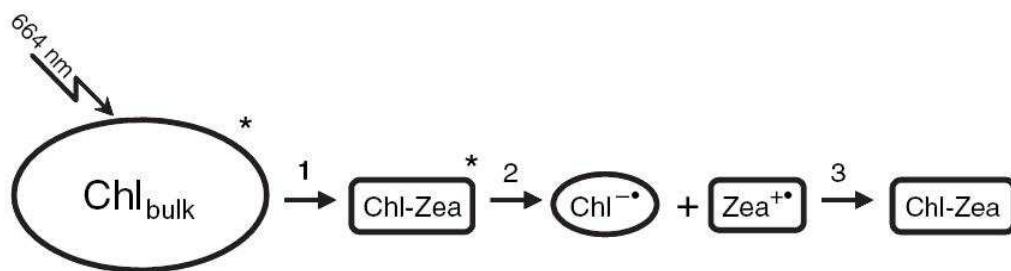
Für die *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt ergeben sich nach Durchführen derselben Messungen nur für die überexprimierte PsbS-Mutante und den Wildtyp unterschiedliche Kinetiken für die beiden Belichtungszustände. Und auch bei den *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit verändertem Xanthophyll Zusammensetzung ist die zusätzliche Anstiegs- und Abklingkomponente im belichteten Zustand nur bei den Mutanten, die Zeaxanthin enthalten, zu finden. Demnach müssen Zeaxanthin und PsbS in den belichteten Thylakoiden vorliegen, um eine zusätzliche Anstiegs- und Abklingkomponente detektieren zu können. Durch die Detektion im Bereich von 900 nm bis 1080 nm kann eine durch die Differenz der belichteten und unbelichteten Kinetiken ein Absorptionsspektrum rekonstruiert werden.



**Abbildung 5 - 7: Rekonstruiertes Absorptionsspektrum (Linie mit Kreisen) erhalten durch die Differenz von Daten aus dem belichteten Zustand mit Daten aus dem unbelichteten Zustand. Das Spektrum des  $\beta$ -Carotin-Radikalkations aus dem  $O_2$ -entwickelnden *Synechocystis* PSII-Kernkomplex bei 20 K ist als gestrichelte Linie dargestellt. <sup>92</sup> (From Nancy E. Holt *et al.*, SCIENCE 307:433-436 (21 January 2005). Reprinted with permission from AAAS. Referenznummer: 08-26770, Permission Letter siehe Anhang)**

Diese zeigt in seinem Absorptionsmaximum und der spektralen Breite eine sehr große Ähnlichkeit zu Spektren von  $\beta$ -Carotin-Radikalkationen (Abbildung 5 - 7). Aus diesem Grund wird die Bildung eines Zeaxanthin-Radikalkations im belichteten Zustand postuliert. Die Detektion der Bildung eines Zeaxanthin-Radikalkations durch selektive Anregung der  $Q_y$ -Bande der Chlorophylle steht im Einklang zu theoretischen Berechnungen. In diesen wurde gezeigt, dass bei einem Abstand von weniger als 5,2 Å von Chlorophyll und Zeaxanthin der Charge-Transfer Zustand die niedrigste Energie besitzt und so ein Elektron von einem Zeaxanthin zu einem Chlorophyll transferiert wird und aus dem angeregten Heterodimer ein Chlorophyll-Radikalanion und ein Zeaxanthin-Radikalkation entsteht.<sup>94</sup>

Diese Ergebnissen führen zu einem Modell (Abbildung 5 - 8), in dem ein Energietransfer aus dem Pool der angeregten Chlorophylle zu einem Chlorophyll-Zeaxanthin Heterodimer abläuft. Dieser angeregte Heterodimer, der wahrscheinlich ein Charge-Transfer-Zustand ist, relaxiert und bildet dadurch ein Chlorophyll-Radikalanion und ein Zeaxanthin-Radikalkation. Nach der Relaxation findet eine Ladungsrekombination statt und ein nicht-angeregter Chlorophyll-Zeaxanthin-Heterodimer entsteht.<sup>92</sup>



**Abbildung 5 - 8: Schematische Darstellung des Mechanismus zur Bildung eines Zeaxanthin-Radikalkations. 1: Energietransfer der Pool-Chlorophylle zum Heterodimer, 2: Relaxation des angeregten Heterodimers zu Chlorophyll-Radikalanion und Zeaxanthin-Radikalkation, 3: Ladungsrekombination zum nicht-angeregten Heterodimer.<sup>92</sup> (From Nancy E. Holt *et al.*, SCIENCE 307:433-436 (21 January 2005). Reprinted with permission from AAAS. Referenznummer: 08-26770, Permission Letter siehe Anhang)**

In diesem Modell entspricht die detektierte Anstiegskomponente mit elf Pikosekunden dem Energietransfer aus dem Pool der angeregten Chlorophylle zu dem Chlorophyll-Zeaxanthin Heterodimer. Simulationen dieses Modells haben ergeben, dass der Energietransfer von den Chlorophyllen zu dem Heterodimer in einer Zeitskala von ca. 15 Pikosekunden bis 200 Pikosekunden abläuft und die Relaxation des angeregten Heterodimers zu einem Chlorophyll-Radikalanion und einem Zeaxanthin-Radikalkation innerhalb von 0,1 Pikosekunden bis einer

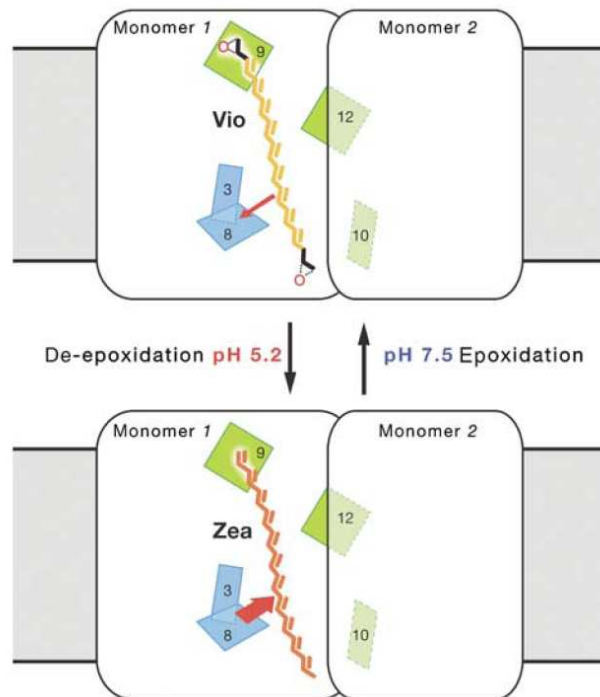
Pikosekunde abgelaufen ist. Diese schnelle Relaxation des angeregten Heterodimers stellt einen effizienten Quenchingmechanismus dar, da so der Energierücktransfer vom angeregten Heterodimer zu den Chlorophyllen verhindert werden kann. Die detektierte Abklingkomponente von 150 Pikosekunden korrespondiert mit der Ladungsrekombination von Chlorophyll-Radikalanion mit Zeaxanthin-Radikalkation zu einen nicht-angeregten Heterodimer.<sup>92</sup>

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei transienten Absorptionsmessungen mit CP24, CP26 und CP29 erhalten. Auch hierbei wird die Bildung eines Chlorophyll-Zeaxanthin Charge-Transfer-Zustands postuliert.<sup>93, 95</sup>

Andere Modelle zur Beschreibung des NPQ postulieren Konformationsänderungen in den Lichtsammelkomplexen, wodurch der Energietransfer zwischen den Pigmenten verändert wird.

Standfuss *et al.*<sup>11</sup> publizierten die Struktur von LHCII aus Erbsen bei einer Auflösung von 2,5 Å. Durch die gute Auflösung können alle vier Carotinoide des LHCII-Monomers eindeutig zugeordnet werden. Die beiden Luteine nehmen dabei eine zentrale Position in dem Monomer ein, wogegen die beiden andern Xanthophylle peripher positioniert sind. Bei einem dieser Xanthophylle handelt es sich um Neoxanthin, das in die Lipiddoppelschicht hineinragt. Das andere Xanthophyll konnte als Violaxanthin identifiziert werden und ist an der Schnittstelle der Monomere positioniert. Von allen vorhandenen Carotinoiden hat Violaxanthin die niedrigste Bindungsaffinität zu dem LHCII-Komplex. Die Bindung von den gleichen Carotinoiden an die jeweiligen Bindungsstellen zeigt, dass sie spezifisch für das entsprechende Carotinoid unter normalen Bedingungen sind. Wird durch den bei der Lichtreaktion entstehenden pH-Gradienten die Violaxanthin-Deepoxidase aktiviert, wird aus Violaxanthin Zeaxanthin gebildet. Dieses hat eine sehr ähnliche molekulare Struktur wie Violaxanthin und kann in dieselbe Bindungstasche eingelagert werden. Durch das Fehlen der Epoxidgruppen an beiden Enden des Moleküls ist Zeaxanthin weniger polar und wird in der hydrophobischen Bindungsstelle stärker gebunden als Violaxanthin. Da Zeaxanthin durch das größere konjugierte  $\pi$ -System einen tieferliegenden  $S_1$ -Zustand hat, kann Zeaxanthin in allen Orientierungen zu Chlorophyllen Energie von diesen aufnehmen. Violaxanthin kann dagegen nur Energie von den Chlorophyllen durch Charge-Transfer bei sehr kurzem Abstand aufnehmen, wenn Violaxanthin und Chlorophyll mit einem coplanaren  $\pi$ -System vorliegen.<sup>96</sup> In LHCII liegt kein Chlorophyll in dieser Anordnung zu Violaxanthin vor und deshalb kann

keine Energie im LHCII von Violaxanthin zu Chlorophyll transferiert werden. Ist dagegen Zeaxanthin in der Violaxanthin-Bindungstasche gebunden, wird alle Energie, die von diesem LHCII-Trimer aufgenommen wird, durch Chlorophyll 8 oder Chlorophyll 9 zu Zeaxanthin weitergeleitet und als Wärme aus dem System abgegeben.

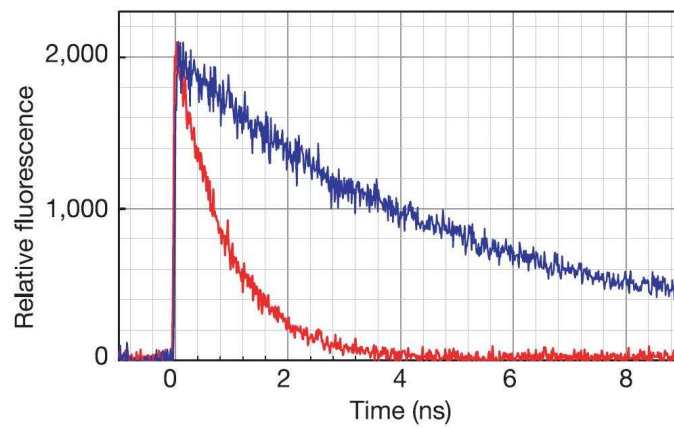


**Abbildung 5 - 9:** Durch das höher gelegene  $S_1$ -Niveau von Violaxanthin wird Energie von Violaxanthin zu den Chlorophyllen transferiert (dünner roter Pfeil). Durch Bindung des unpolareren Zeaxanthin in der Bindungstasche entsteht eine stärkere Bindung und die Absenkung des  $S_1$ -Niveaus durch das größere  $\pi$ -System bewirkt einen Energietransfer von den Chlorophyllen zu Zeaxanthin.<sup>11</sup> (Abdruck nach Genehmigung von Macmillan Publisher LTd: The EMBO Journal, copyright 2005, Lizenznummer: 1984101402910, Lizenzvertrag siehe Anhang)

Durch die Bindung von Zeaxanthin an die Violaxanthin-Bindungstasche im LHCII wird der LHCII-Trimer zu einer Energiesenke, durch die überschüssige Energie aus der Pflanze abgeführt werden kann (Abbildung 5 - 9). Es gelangt weniger Energie zu den Reaktionszentren im PSII.<sup>11</sup>

Untersuchungen von LHCII-Kristallen führten zu dem Ergebnis, dass die Fluoreszenz dieser im Vergleich zu trimerem LHCII in Lösung gequencht ist (Abbildung 5 - 10).<sup>97</sup> Für LHCII wurde eine Lebensdauer von ca. vier Nanosekunden ermittelt, während die Fluoreszenz von LHCII bei Selbst-Assoziation zu Oligomeren oder Aggregaten auf 0,2 bis 1,5 Nanosekunden absinkt.<sup>98</sup> Durch die Untersuchungen und den Vergleich von LHCII-Oligomeren und LHCII-

Trimeren könnte ein Modell zum Verständnis von nicht-photochemischem Quenching gewonnen werden. Die Struktur von LHCII durch Röntgenstrukturanalyse zeigt, dass zwischen verschiedenen LHCII-Trimeren nur zwei Chlorophyll-Paare eine schwache Wechselwirkung eingehen können und so auch im Kristall die LHCII-Trimere separat funktionieren. Deshalb ist es umso erstaunlicher, dass in Kristallen die LHCII-Fluoreszenz gequencht ist. Die Bestimmung des Lebensdauer von 0.89 Nanosekunden von LHCII-Kristallen zeigt, dass Kristalle eher Oligomeren als Trimeren gleichen und daher in LHCII-Kristallen Energiesenken vorkommen, die in der Lösung von LHCII-Trimer nicht vorliegen.



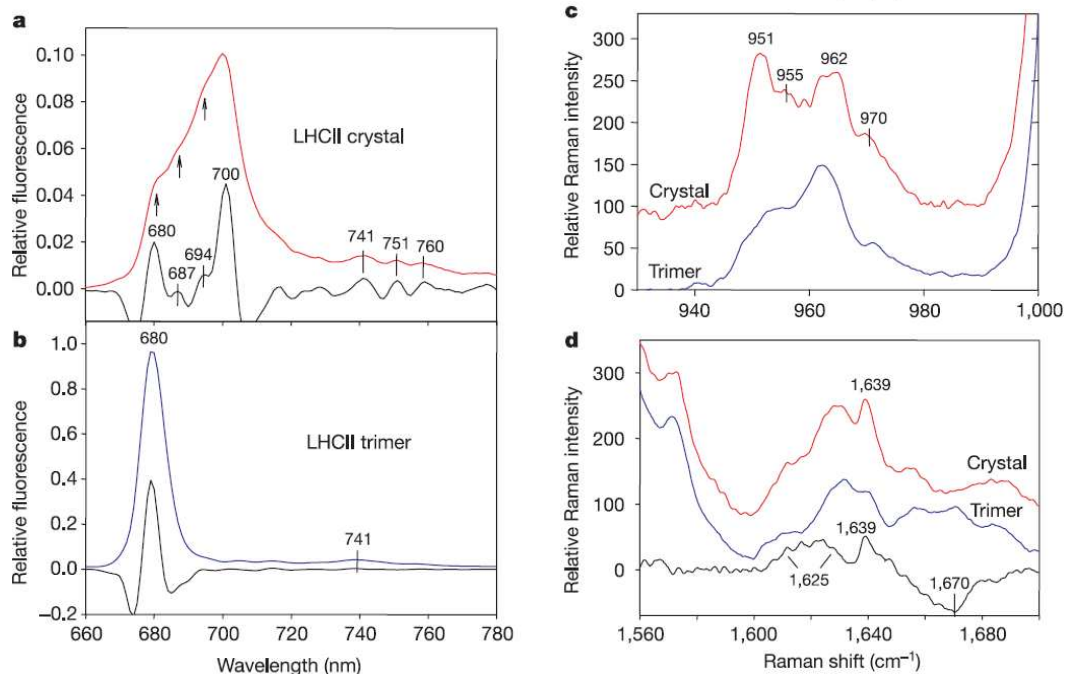
**Abbildung 5 - 10: Fluoreszenzabklingkurven von LHCII-Trimeren (blau) und LHCII-Kristallen (rot)<sup>97</sup>**  
 (Abdruck nach Genehmigung von Macmillan Publisher LTd: Nature, copyright 2005, Lizenznummer: 1983680823143, Lizenzvertrag siehe Anhang)

Um die Unterschiede in den LHCII-Kristallen zu den LHCII-Trimeren zu verifizieren, wurden Fluoreszenzemissions- und Resonanzramanspektren aufgenommen (Abbildung 5 - 11). Im Fluoreszenzemissionspektrum der Kristalle sind Verbreiterung der Peaks und eine Rotverschiebung im Vergleich zu LHCII-Trimeren zu erkennen, außerdem zeigt das Spektrum der Kristalle mehrere ausgeprägte Peaks, die auf Veränderungen in der Chlorophyllkonfiguration hinweisen. Die Ergebnisse aus den Resonanz Raman Messungen deuten außerdem auf Unterschiede in der Pigment Konfiguration und den Wechselwirkungen von Pigmenten und Proteinen im Kristall verglichen mit LHCII-Trimeren hin. Dabei sind im LHCII-Kristall die Banden bei  $951\text{ cm}^{-1}$  und  $955\text{ cm}^{-1}$  erhöht, was als eine Verdrillung von Neoxanthin gedeutet wird. Außerdem sind die Wechselwirkungen von Chlorophyll b Molekülen mit der Umgebung sehr verschieden im Kristall verglichen mit dem Trimer. Im Trimer liegt ein oder mehrere Chlorophyll b Moleküle frei vor, wogegen im Kristall eine



## 5 Diskussion

Wasserstoffbrückenbindung entsteht. Diese Wechselwirkungen können nicht aus Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Trimeren stammen, da dafür die Bandbreite zu schmal ist.



**Abbildung 5 - 11:** a,b: Niedrigtemperatur Fluoreszenz Spektren von LHCII in Kristallen (a, rot) und Trimeren (b, blau) und zweiten Derivaten (schwarz). c, d: Resonanz Raman Spektren von Neoxanthin (c) und Chlorophyll b (d) in Kristallen (rot) und Trimern (blau). Differenz der Spektren von Kristallen minus Trimere (d, schwarz)<sup>97</sup> (Abdruck nach Genehmigung von Macmillan Publisher LTd: Nature, copyright 2005, Lizenznummer: 1983680823143, Lizenzvertrag siehe Anhang)

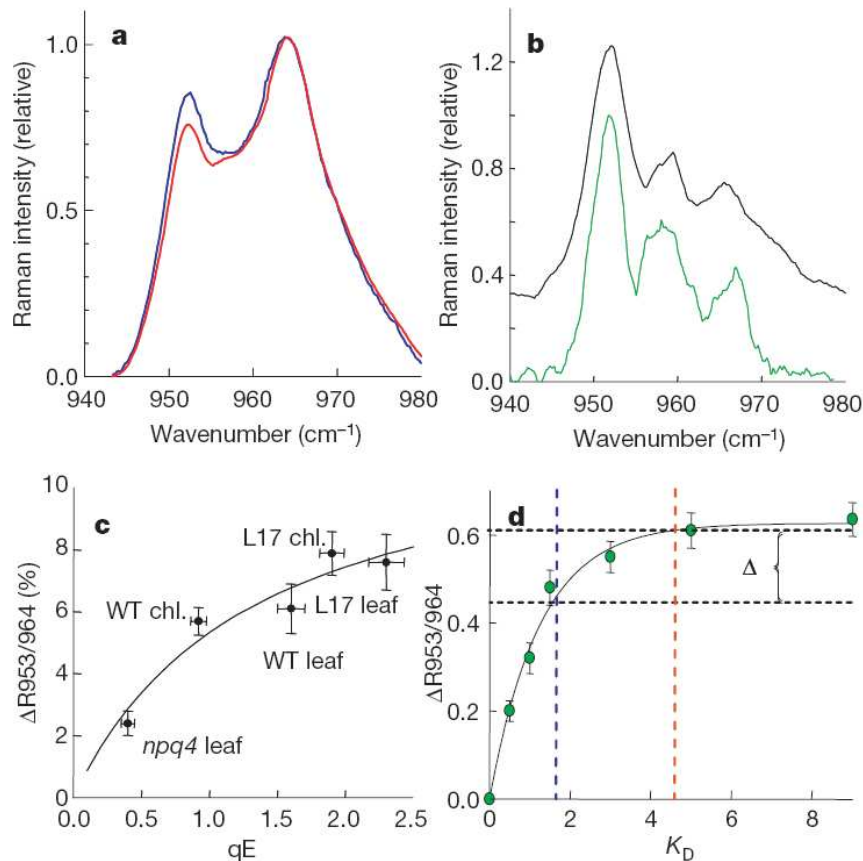
Deshalb wird eine Konformationsänderung postuliert, die zu einer strukturellen Reorganisation innerhalb jedes Trimers führt. Die Kristallisation bewirkt eine Konformationsänderung in LHCII, wodurch die Orientierungen und Abstände zwischen den Pigmenten verändert werden und so eine Quenchingstelle entsteht. Durch die Rotverschiebung des Fluoreszenzemissionspektrums könnten die Quenchingstellen durch Excimere oder Dimere von Chlorophyllen gebildet werden. In der LHCII Struktur liegen eine Vielzahl von Chlorophyllanordnungen vor, die solche Dimere bilden könnten. Bei zwei Chlorophyll-Paaren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für die Dimerbildung ist zu erkennen, dass entweder Lutein oder Neoxanthin in enger Nachbarschaft liegen und so die Hypothese unterstützen, dass Carotinoide eine wichtige Rolle bei der Abführung der überschüssigen Energie spielen. Dagegen vollführt Neoxanthin eine Konformationsänderung bei der

Anpassung von LHCII an den belichteten Zustand. Außerdem ist auch die Bindungsstelle von Violaxanthin in näherer Umgebung zu den beiden oben genannten Quenchingstellen. Die enzymatische Deepoxidierung von Violaxanthin zu Zeaxanthin bei sinkendem pH-Wert könnte die strukturellen Veränderungen im LHCII modulieren. Durch den Austausch von Violaxanthin zu Zeaxanthin könnten die Wechselwirkungen der Pigmente verstärkt werden, wogegen PsbS für die Messung der pH-Wert Veränderung im Lumen wichtig zu sein scheint und so die Notwendigkeit zur strukturellen Veränderungen im LHCII signalisiert.<sup>90</sup> Diese Ergebnisse führen zur Postulation eines Modells in dem bei niedrigem pH-Wert des Lumens PsbS mit LHCII wechselwirkt und so eine Konformationsänderung fördert und das eigentliche Quenching in den LHCII-Trimeren durch Bildung von Chlorophyll-Dimeren abläuft, wie es in den Kristallen gemessen wurde.<sup>97</sup>

Ein anderes Modell von Ruban *et al.* beschreibt die Konformationsänderung des LHCII durch Einfluss von Neoxanthin genauer.<sup>46</sup> Dabei wurden Resonanz Raman Spektren von Neoxanthin aufgenommen. Durch die Belichtung von Chloroplasten entsteht eine Konformationsänderung des LHCII, dies bewirkt verdrillt Konfiguration von Neoxanthin, wodurch ein Raman Signal bei  $953\text{ cm}^{-1}$  entsteht (Abbildung 5 - 12).

Isolierte Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* zeigten im Resonanz Raman Spektrum im unbelichteten Zustand zwei Banden bei  $953\text{ cm}^{-1}$  und  $964\text{ cm}^{-1}$ . Nach der Belichtung der Chloroplasten steigt die Intensität der  $953\text{ cm}^{-1}$  Bande um 5 % bis 7 % an relativ zur  $964\text{ cm}^{-1}$  Bande. Aus den beiden Spektren im unbelichteten und belichteten Zustand wird das Neoxanthin spezifische Spektrum berechnet und mit einem Spektrum von belichtetem LHCII verglichen. In beiden Spektren sind drei charakteristische Banden zu erkennen. Weitere Messungen von Chloroplasten und Blättern von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp und Mutanten mit verändertem PsbS Gehalt zeigten einen Zusammenhang zwischen qE und einer Zunahme der  $953\text{ cm}^{-1}$  Bande. Des Weiteren wurde isoliertes LHCII vermessen, das in verschiedenen Oligomerisierungszuständen vorlag, um die Veränderungen des gebundenen Neoxanthin im Zusammenhang mit Änderungen in qE zu beobachten.

Unter Mitwirkung anderer Xanthophylle wird eine maximale Änderung der Intensität bei  $953\text{ cm}^{-1}$  bei 10 % bis 13 % erwartet. Die gemessene Änderung liegt bei ca. 8 % und damit in der berechneten Größenordnung. Aus diesen Ergebnissen folgt das bei Eintreten von qE eine Konformationsänderung auftritt, die nicht-photochemisches Quenchen bewirkt.

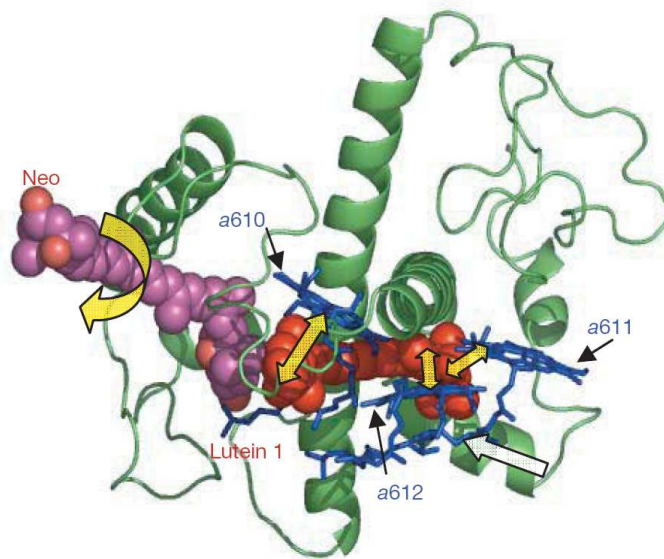


**Abbildung 5 - 12:** a: Resonanz Raman Spektren von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp Chloroplasten im belichteten (blau) und unbelichteten (rot) Zustand. b: Differenz der Raman Spektren aus a (grün) und im Vergleich ein Raman Spektrum (schwarz) von LHCII im belichteten Zustand. c: Das Verhältnis von 953  $\text{cm}^{-1}$ / 964  $\text{cm}^{-1}$  zu qE bei verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit verändertem PsbS Gehalt. d: Veränderungen der relativen Raman Intensität bei 953  $\text{cm}^{-1}$  von LHCII bei verschieden starkem Quenching.<sup>46</sup> (Abdruck nach Genehmigung von Macmillan Publisher LTd: Nature, copyright 2007, Lizenznummer: 1984101056821, Lizenzvertrag siehe Anhang)

Transient Absorptionsspektroskopie an isolierten LHCII im belichteten und unbelichteten Zustand bei verschiedenen Wellenlängen zeigten große Unterschiede für beide Proben. Für die belichteten Proben bei den verschiedenen Wellenlängen sind unterschiedliche Zeitskalen zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass begleitend zu dem Abklingen der angeregten Zustände der Chlorophylle eine andere Spezies transient besetzt wird. Diese Spezies kann als  $S_1$ -Niveau der Carotinoide identifiziert werden. Dieses Ergebnis stützt den Energietransfer von Chlorophyllen zu Carotinoiden beim nicht-photochemischen Quenching. Da die Proben aber nur Violaxanthin und kein Zeaxanthin enthalten, muss Lutein oder Neoxanthin für die Absorptionsänderungen verantwortlich sein, die mit dem Quenchingmechanismus verknüpft werden. Durch den Vergleich des Ausbleichens des Quenching Zustandes mit dem

Ausbleichen des Carotinoid Triplet-Niveaus zeigt, dass die zugehörigen negativen Peaks zusammenfallen. Daraus wird gefolgert, dass Lutein 1 der Quencher sein muss.

Da sowohl isolierte LHCII als auch intakte Chloroplasten vermessen wurden, wird folgendes Modell postuliert (Abbildung 5 - 13). Nicht-photochemisches Quenchen wird initiiert durch eine Konformationsänderung des LHCII, diese entsteht durch die Änderung des pH-Wertes im Lumen durch den Ablauf der Lichtreaktion. Durch die Konformationsänderung des LHCII entsteht ein größerer Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein 1 und die weitergeleitete Energie wird dann als Wärme aus dem System abgeführt.<sup>46</sup>



**Abbildung 5 - 13: Modell zur Veranschaulichung der Konformationsänderung und des dadurch entstehenden Quenchings.** Lutein 1 (rot) ist sehr stark assoziiert zu den Chlorophyllen a610, a611, a612 (schwarze Pfeile). Neoxanthin (pink) wird durch die Konformationsänderung verdrillt (gelber dicker Pfeil) und dadurch wird Lutein 1 weiter zu den Chlorophyll-Clustern bewegt (weißer Pfeil) und es entsteht ein Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein 1 (kleine gelbe Pfeile)<sup>46</sup> (Abdruck nach Genehmigung von Macmillan Publisher LTd: Nature, copyright 2007, Lizenznummer: 1984101056821, Lizenzvertrag siehe Anhang)

Ein weiteres Protein, das für die effektive Abfuhr von überschüssiger Energie nötig ist, ist PsbS, eine Untereinheit des PSII. Für die volle Aktivierung dieses Proteins ist sowohl Zeaxanthin als auch Lutein wichtig. Zwei Modelle, die die Rolle von PsbS beim nicht-photochemischen Quenchen erklären, sind postuliert worden. PsbS könnte demnach entweder

## 5 Diskussion

selbst direkt als Quenchingstelle wirken oder nur die Rolle eines Protonen-sensitiven Triggermoleküls einnehmen.

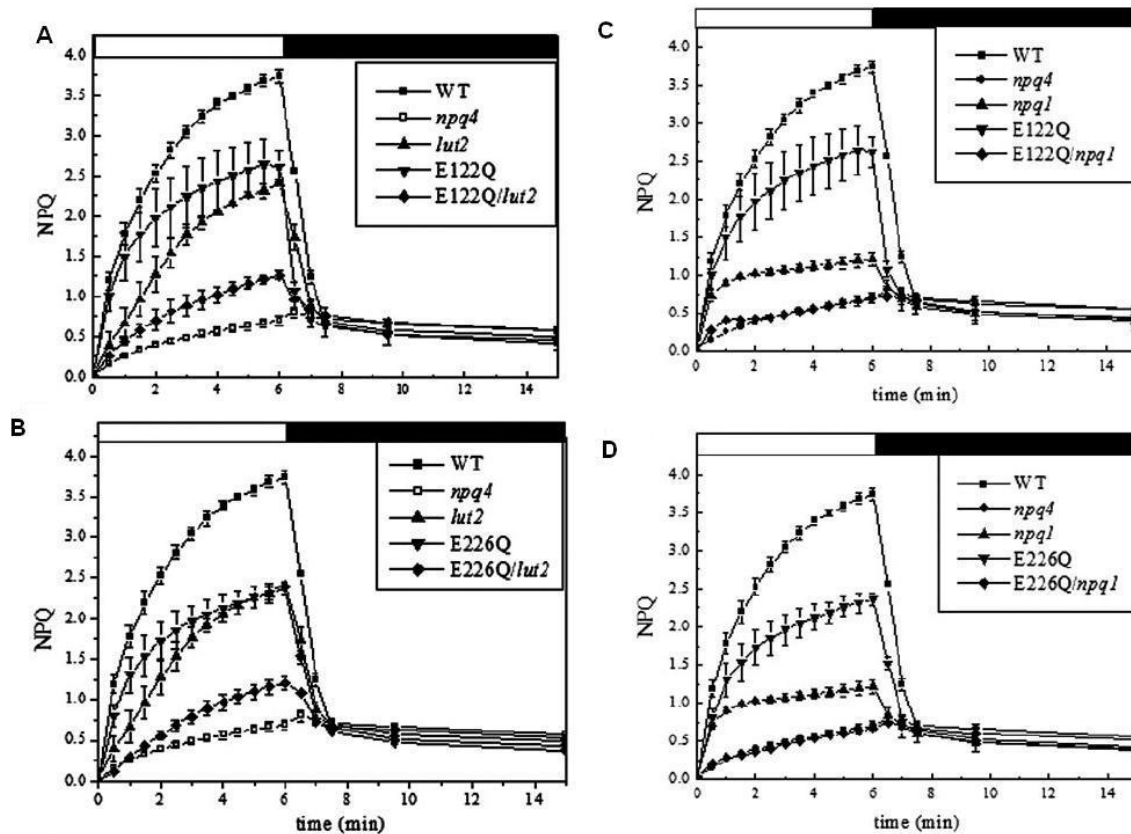


Abbildung 5 - 14: Darstellung der NPQ-Parameter für *lut2*- (A, B) und *npq1*-Mutanten (C, D) im Vergleich mit den jeweiligen Doppelmutanten<sup>57</sup> (Abdruck nach Genehmigung von ASBMB Journals: Journal of Biological Chemistry, Lizenzvertrag siehe Anhang)

Durch die Untersuchungen von *Arabidopsis thaliana* Xanthophyll-Doppelmutanten *lut2/npq2*, die nur Zeaxanthin als einziges Xanthophyll enthält und der Doppelmutante *npq1/lut2* in der nur Violaxanthin als einziges Xanthophyll vorliegt (Abbildung 5 - 14), konnte gezeigt werden, dass bei Vorhandensein von Zeaxanthin die Fähigkeit des nicht-photochemische Quenchen nur reduziert ist<sup>38</sup>, wogegen bei alleinigem Vorliegen von Violaxanthin kein nicht-photochemisches Quenchen auftritt.<sup>56</sup> Dies führte zur der Postulation des „Zwei-Xanthophyll-Bindungsstellen-Modell“, in dem eine Protonierung der Glutamatreste in der Proteinseitenkette zu einer Konformationsänderung des PsbS führt, wodurch die Bindungsstellen für Zeaxanthin aktiviert werden. Dieses Modell wurde unterstützt durch das Auftreten eines 535 nm Bande, die während des nicht-photochemischen Quenchings entsteht und PsbS-abhängig ist und auch im Raman-Spektrum von Zeaxanthin vorgefunden wurde.

Außerdem wurde bei *in vitro* Bindungen von PsbS mit Zeaxanthin eine Absorptionsbande bei ca. 530 nm festgestellt. In dem Trigger-Modell wird PsbS als ein pH-Sensor agieren, das Abführen der überschüssigen Energie wird von Chlorophyll- und Carotiniodbindenden Proteinen durchgeführt, die durch die Konformationsänderung des PsbS aktiviert wurden.<sup>40</sup>

Untersuchungen von Bonente *et al.*<sup>57</sup> an *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit kombinierter Mutation der Xanthophyllbiosynthese und der protonierbaren Proteinseitenketten des PsbS ergaben, dass die Quenchingkapazität weder bei Fehlen von Lutein noch bei Zeaxanthin abhängig ist von einer der beiden Protonierungsstellen.

Das weist darauf hin, dass die eventuell vorhandenen Bindungsstellen für Xanthophylle in PsbS nicht Zeaxanthin oder Lutein spezifisch sind.

Außerdem wurden *in vitro* Experimente bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt, um die Bindung von Lutein und Zeaxanthin an PsbS zu bestimmen. Diese Experimente wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt wie für andere Lichtsammelkomplexe, aber PsbS zeigte dabei ein anderes Verhalten als alle anderen Lichtsammelproteine.

Diese Ergebnisse zeigen, dass PsbS wahrscheinlich eher ein pH-sensitives Molekül ist, das den lumenalen pH-Wert detektiert und die Umwandlung der Lichtsammelproteine von einer nicht-quenchenden zu einer quenchenden Konformation kontrolliert. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse gestützt, die zeigen, dass PsbS *in vitro* auch in einer gefalteten Konformation vorliegt, wenn keine Pigmente vorhanden sind.

Dies führt zu der Postulation eines Trigger-Modells für PsbS, das durch die Protonierung von Glutamatresten in der lumenalen Proteinkette eine Konformationsänderung erfährt. Diese ist induziert durch die Wechselwirkungen der Proteinhelices von PsbS mit benachbarten Proteinuntereinheiten der Lichtsammelkomplexe ebenfalls eine Konformationsänderung in diesen Lichtsammelkomplexen und stabilisiert so die quenchende Konformation dieser. Die eigentliche Quenchingstelle liegt in den Lichtsammelkomplexen vor und wird durch Konformationsänderungen des PsbS aktiviert.<sup>40, 57</sup>

Generell ist zu erkennen, dass die Veränderung des pH-Wertes im Lumen als entscheidender Schritt bei Modellen zum nicht-photochemischen Quenching anerkannt ist. Die Veränderung bewirkt die enzymatische Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin, was entweder einen Energietransfer von Chlorophyllen zu Carotinoiden bewirkt oder zu einer Konformationsänderung führt. Außerdem wird durch den niedrigen pH-Wert die Protonierung

## 5 Diskussion

verschiedener Proteinkomplexe erreicht, welche dann direkt zu einem Quenchinprozess oder zu Konformationsänderungen, die das Quenchen bewirken, führen.

Zusammenfassenden werden in der folgenden Tabelle 1 die vorgestellten Modelle aufgeführt und die jeweiligen postulierten Mechanismen kurz erläutert:

**Tabelle 1: Zusammenstellung der verschiedenen Modelle für das nicht-photochemische Quenchen**

Nr.	Name	Autor	Mechanismus
1	molecular gear shift model	Frank <i>et al.</i> <sup>24</sup> Wehling <i>et al.</i> <sup>25</sup>	S <sub>1</sub> -Niveau von Zeaxanthin ist energetisch tiefer als das von Violaxanthin, dadurch entsteht Energietransfer von Chlorophyllen zu Zeaxanthin.
2	Heterodimer	Ma <i>et al.</i> <sup>28</sup>	Energietransfer durch die Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimers
3	Zeaxanthin-Radikalkation	Holt <i>et al.</i> <sup>92</sup>	Nach Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimers zerfällt dieser zu einem Zeaxanthin-Radikalkation und einem Chlorophyll-Radikalanion
4	Hydrophobe Bindungstasche	Standfuss <i>et al.</i> <sup>11</sup>	Stärkere Bindung des Zeaxanthin in der Bindungstasche als Violaxanthin und durch niedrigeres S <sub>1</sub> -Niveau erfolgt Energietransfer von Chlorophyllen zu Zeaxanthin.
5	Wechselwirkung PsbS mit LHCII	Pascal <i>et al.</i> <sup>97</sup>	Wechselwirkungen von PsbS mit LHCII führen zu einer Konformationsänderung des LHCII, Quenching läuft durch die Bildung von Chlorophyll-Dimeren ab.
6	Energietransfer zu Lutein	Ruban <i>et al.</i> <sup>46</sup>	Konformationsänderung des LHCII durch die Verringerung des pH-Wertes, diese Konformationsänderung bewirkt einen Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein
7	Zwei-Xanthophyll-Bindungsstellen-Modell	Bassi <i>et al.</i> <sup>40</sup>	Durch Konformationsänderungen des PsbS werden Zeaxanthin-Bindungsstellen aktiviert und überschüssige Energie über PsbS abgeleitet.
8	PsbS als Trigger	Bonente <i>et al.</i> <sup>57</sup>	Konformationsänderung des PsbS durch Verringerung des pH-Wertes führt zu einer Konformationsänderung des LHCII, in LHCII liegt die Quenchingstelle vor.



## 5.2 Diskussion der Messergebnisse

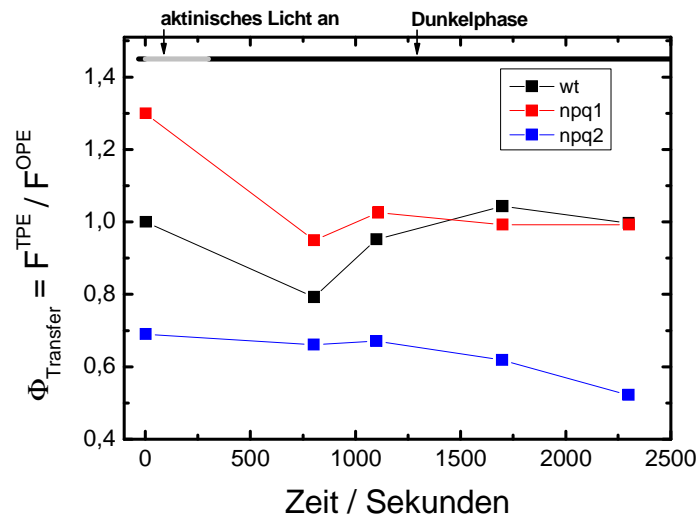
Durch die kombinierte Ein- und Zweiphotonen-Messung, jeweils mittels sättigender Pulse, kann die Energietransfereffizienz  $\Phi_{\text{Transfer}}$  zwischen den Carotinoiden und den Chlorophyllen bestimmt werden. Da sowohl Wildtyp-Pflanzen als auch Mutanten untersucht wurden, können hieraus Aussagen über die Beteiligung der verschiedenen Xanthophylle oder des PsbS am Quenchen getroffen werden. Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse kann eine Verbindung mit den diskutierten Modellen hergestellt werden.

Es werden Fluoreszenzmessungen an Wildtyp-Pflanzen und Mutanten von *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Zwei Mutanten besitzen einen enzymatisch gehemmten Xanthophyll-Zyklus, zwei weitere einen veränderten Gehalt an PsbS. Desweiteren wird eine Mutante vermessen, die eine Hemmung der Lutein-Synthese besitzt. Gemessen wird die Fluoreszenz der Chlorophylle nach direkter Einphotonenanregung der Chlorophylle sowie nach indirekter Anregung durch Zweiphotonenanregung der Carotinoide sowohl im hell- als auch im dunkeladaptierten Zustand. Die aus den Fluoreszenzintensitäten ermittelten NPQ<sub>OPE</sub>-Daten sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur<sup>19, 53, 75-77</sup> und bestätigen das Vorliegen der gewünschten Mutationen. Auch die erstmals ermittelten NPQ<sub>TPE</sub>-Daten zeigen dies.

### 5.2.1 Diskussion der Transfereffizienz im dunkeladaptierten Zustand

Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Transfereffizienzen für den helladaptierten Zustand und dunkeladaptierten Zustand getrennt von einander betrachtet und die jeweils anderen Daten aus den Diagrammen ausgeblendet. Diese Trennung ist sinnvoll, da beim nicht-photochemischen Quenching wahrscheinlich zwei verschiedene Prozesse ablaufen: Ein langsamerer im dunkeladaptierten Zustand, ein schnellerer im helladaptierten Zustand. Außerdem werden Xanthophyll-Mutanten, PsbS- und Lutein-Mutanten gesondert diskutiert.

Durch die Berechnung der Transfereffizienzen aus den absoluten Fluoreszenzintensitäten der Pflanzen ergibt sich folgende Abbildung 5 - 15. Dabei wurden mindestens fünf verschiedene Pflanzen unterschiedlicher Generationen gemessen und die Mittelwerte in den folgenden Abbildungen dargestellt. Die höchste Transfereffizienz des Wildtyps wurde auf eins normiert.



**Abbildung 5 - 15:** Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit Hemmungen des Xanthophyllzyklus im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung

Der Mittelwert der Anfangstransfereffizienz vor der Helladaption der Pflanzen ist für die Zeaxanthin-Mutante (*npq2*) um ungefähr 30 % niedriger als der entsprechende Wert der Wildtyp-Pflanze. Dagegen ist der Anfangswert der Transfereffizienz für die Violaxanthin-Mutante (*npq1*) um ungefähr 30 % höher als die Anfangstransfereffizienz der Wildtyp-Pflanze. Diese Anfangswerte sind in der folgenden Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Zusammenstellung der Fluoreszenzintensitäten nach Ein- oder Zweiphotonenanregung und der daraus resultierenden Anfangstransfereffizienzwerte für Mutanten mit gehemmtem Xanthophyllzyklus und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*

	$F_{\text{TPE}}$	$F_{\text{OPE}}$	$\Phi_{\text{Transfer}} = F_{\text{TPE}} / F_{\text{OPE}}$
Wildtyp	1	1	1
Zeaxanthin ( <i>npq2</i> )	$0.62 \pm 0.18$	$0.89 \pm 0.08$	$0.69 \pm 0.18$
Violaxanthin ( <i>npq1</i> )	$1.37 \pm 0.36$	$1.06 \pm 0.18$	$1.3 \pm 0.36$

Die einzige Pflanze, die eine lichtabhängige Abnahme und Erholung der Transfereffizienz zeigt, ist die Wildtyp-Pflanze. Dabei sinkt die Transfereffizienz bis kurz nach der Belichtungsphase ab und steigt langsam während der Dunkeladaption wieder bis auf den Anfangswert an.

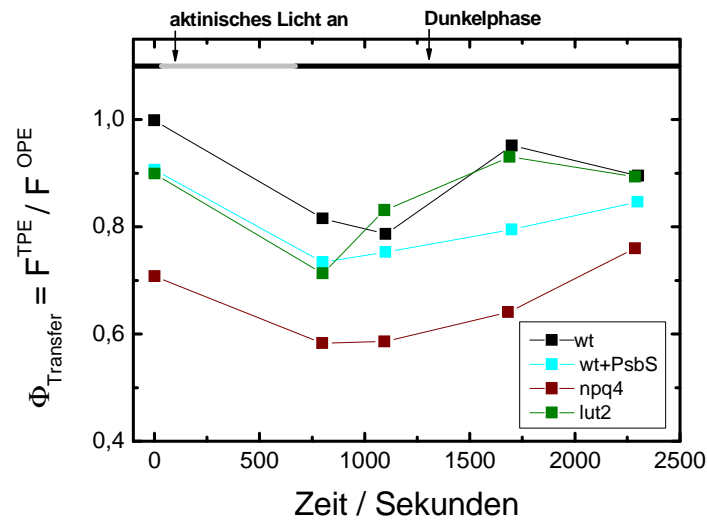
Die Transfereffizienz der *npq2*-Mutante, die nur Zeaxanthin enthält, verändert sich nicht nach der Belichtung, auch während der Dunkelphase bleibt sie fast konstant. In der Dunkelphase bleibt die Transfereffizienz der *npq1*-Mutante auch konstant. Nach der Belichtungsphase nimmt sie dagegen erheblich ab. Die Ursache hierfür könnten Zerstörungs- oder Inhibierungsprozesse in der Pflanze sein, denn da diese Mutante kein Zeaxanthin bilden kann, wird die überschüssige Energie nicht als Wärme aus der Pflanze abgeführt, sondern es finden unerwünschte Reaktionen statt, die die Pflanze schädigen können.

Die Zeitverzögerung in der Regeneration des  $\Phi_{\text{Transfer}}$ -Koeffizienten nach der Belichtungsperiode könnte eventuell ein wichtiges Detail für das Verständnis des Zusammenhangs von schneller Regulation des Quenchens und langsamer enzymatischer Umwandlung der Xanthophylle sein.

Generell zeigen die ermittelten Transferkoeffizienten eine Korrelation mit dem Energietransfer aus dem  $S_1$ -Niveau der Carotinoide zum  $Q_y$ -Niveau der Chlorophylle. Da nur der *wt* eine Erholung des Transferkoeffizienten zeigt, scheint für einen funktionierenden Energietransfer während Dunkel- und Helladaption ein intakter Xanthophyll-Zyklus nötig zu sein. Nur das Vorhandensein einzelner Xanthophyll-Carotinoide führt nicht zu einem effektiven, regulierbaren Schutz der Photosysteme in Pflanzen bei verschiedenen Belichtungszuständen.<sup>39</sup>

Bei den Mutanten ohne Veränderungen des Xanthophyll-Zyklus ist die Anfangstransfereffizienz vor der Helladaption für alle vermessenen Pflanzen niedriger als für den Wildtyp (Abbildung 5 - 16 und Tabelle 3). Für die Mutante ohne PsbS ist die Anfangstransfereffizienz auch um ca. 30 % niedriger als für den Wildtyp. Die Mutanten mit erhöhtem PsbS-Gehalt und die mit einer Hemmung in der Synthese von Lutein zeigen eine verringerte Anfangstransfereffizienz von 10 % gegenüber dem Wildtyp.

Alle in diesem Diagramm dargestellten Pflanzen zeigen einen ähnlich steilen Abfall der Transfereffizienz nach der Belichtungsphase. Während der Dunkeladaption steigen bei allen vermessenen Pflanzen die Transfereffizienzen wieder an. Dabei zeigen *lut2* und der Wildtyp die schnellste Regeneration. Für die beiden Mutanten mit erhöhter bzw. keiner PsbS Konzentration steigen die Transfereffizienzen langsamer an.



**Abbildung 5 - 16:** Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt oder Hemmung in der Lutein Synthese im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung

**Tabelle 3:** Zusammenstellung der Fluoreszenzintensitäten nach Ein- oder Zweiphotonenanregung und der daraus resultierenden Anfangstransfereffizienzwerte für Mutanten mit funktionierendem Xanthophyllzyklus und Wildtyp von *Arabidopsis thaliana*

	TPE	OPE	$\Phi_{\text{Transfer}} = F_{\text{TPE}} / F_{\text{OPE}}$
Wildtyp	1	1	1
PsbS erhöht ( <i>wt+PsbS</i> )	$1.09 \pm 0.17$	$1.21 \pm 0.26$	$0.91 \pm 4.56 \cdot 10^{-5}$
PsbS nicht vorhanden ( <i>npq4</i> )	$1.03 \pm 0.14$	$1.45 \pm 0.12$	$0.71 \pm 3.04 \cdot 10^{-5}$
Lutein nicht vorhanden ( <i>lut2</i> )	$0.85 \pm 0.07$	$0.95 \pm 0.05$	$0.90 \pm 2.53 \cdot 10^{-5}$

Dass bei allen Mutanten der Abbildung 5 - 16 ein Absinken der Transfereffizienz nach der Belichtung und eine Regeneration während der Dunkeladaption zu beobachten ist zeigt, dass diese Effekte nicht von der Konzentration von PsbS oder Lutein abhängen. Dies wird bestärkt durch die Beobachtung, dass sowohl die *npq4*- als auch die *wt+PsbS*-Mutante einen parallelen Verlauf der Transfereffizienz zeigen. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass ein solches Verhalten auf einen funktionierenden Xanthophyllzyklus hinweist. Nur bei Hemmungen der Enzyme dieses Zyklus wird eine konstante Transfereffizienz nach der Belichtungsphase (*npq1* und *npq2*) oder sogar während des gesamten Experimentes (*npq2*) beobachtet.

### 5.2.2 Diskussion der Transfereffizienz im helladaptierten Zustand

Die in diesen Abbildungen aufgetragenen Transfereffizienzen wurden ebenfalls aus den absoluten Fluoreszenzintensitäten berechnet. Durch die Messung von mindestens fünf Pflanzen wurden die dargestellten Mittelwerte erhalten.

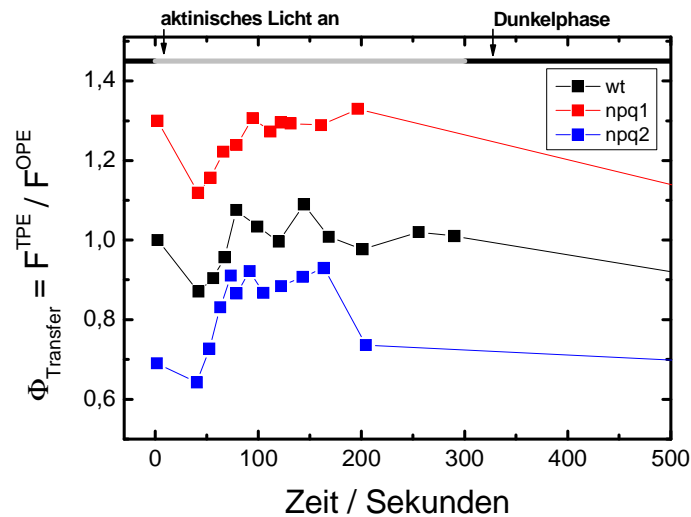
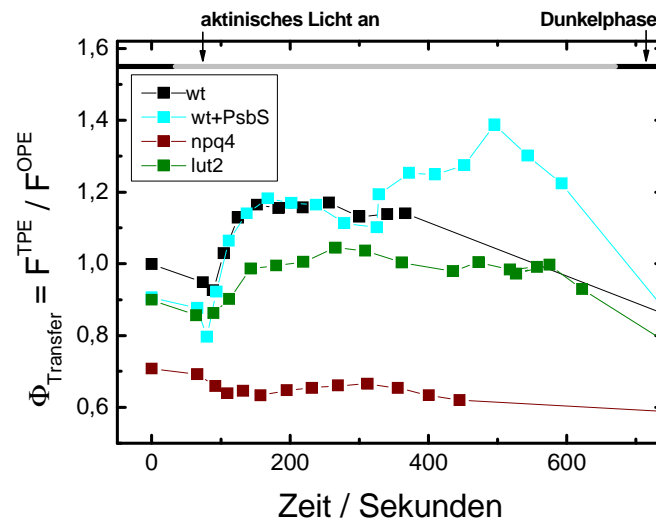


Abbildung 5 - 17: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit Hemmungen des Xanthophyllzyklus im helladaptierten Zustand

Bei allen Pflanzen ist zu erkennen, dass zu Beginn der Belichtung die Transfereffizienz sofort absinkt und sich danach aber sehr schnell wieder erholt (Abbildung 5 - 17 und Abbildung 5 - 18). Nach diesem sehr starken Anfangsabfall steigt die maximale Transfereffizienz für die *npq1*-Mutante während der Belichtung nicht höher als auf den Anfangswert der Messreihe an. Bei der Wildtyppflanze und der *npq2*-Mutante dagegen steigt die maximale Transfereffizienz während der Belichtungsphase auf einen höheren Wert als den Anfangswert an. Dass ein Anstieg sowohl bei dem Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* als auch bei den beiden Mutanten mit gehemmtem Xanthophyll-Zyklus beobachtet wird zeigt, dass dieser Prozess unabhängig von der Funktion des Xanthophyllzyklus ist.

Desweiteren deuten aber der im Vergleich zum Wildtyp große Anstieg bei der *npq2*-Mutante und der geringere Anstieg bei der *npq1*-Mutante darauf hin, dass Zeaxanthin auch im Quenchingprozess des helladaptierten Zustands eine Rolle spielen könnte.



**Abbildung 5 - 18: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von *Arabidopsis thaliana* und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt oder Hemmung in der Lutein Synthese im helladaptierten Zustand**

Bei den in Abbildung 5 - 18 dargestellten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen ist zu erkennen, dass für alle Pflanzen zu Beginn der Belichtung ein Abfall in der Transfereffizienz zu beobachten ist. Nur die Wildtyp-Pflanze und die Mutante mit erhöhter Konzentration an PsbS zeigen einen großen Anstieg der Transfereffizienz während der Belichtungsphase. Dabei ist der Anstieg des Wildtyps geringer als der der *wt+PsbS*-Mutante. Die *npq4*-Mutante zeigt dagegen nach einem sehr geringen Abfall zu Beginn der Belichtung eine konstant bleibende Transfereffizienz über die gesamte Belichtungsdauer. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Transfereffizienz des helladaptierten Zustands mit dem Vorhandensein von PsbS korreliert und so ein Maß für nicht-photochemisches Quenchen sein könnte. Des Weiteren ist der Anstieg der Transfereffizienz während der Belichtung bei der *lut2*-Mutante sehr viel geringer als bei der Wildtyp-Pflanze. Da in der *lut2*-Mutante statt Lutein vermehrt  $\beta$ -Carotin und Xanthophyllcarotinoide in der Pflanze vorliegen, sind wahrscheinlich die entsprechenden Bindungsstellen von Lutein mit anderen Carotinoiden besetzt. Diese Fehlbesetzungen führen zu einem verminderten Energietransfer in den Mutanten mit gehemmter Lutein-Synthese. Dies zeigt, dass der Energietransfer des helladaptierten Zustands zumindest bedingt auch von dem Vorhandensein von Lutein beeinflusst wird.

## 5 Diskussion

Aus diesen Ergebnissen lassen sich zusammenfassend folgende Zusammenhänge ableiten:

Es sind zwei verschiedene Prozesse zu erkennen, die überlagert sind. Der erste Prozess ist in der dunkeladaptierten Phase vor und nach der Belichtung zu beobachten und hängt von der enzymatischen Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin ab. Dieser Xanthophyllzyklus wird durch die Verringerung des pH-Wertes im Lumen des Thylakoiden aktiviert. Der zweite Prozess liegt dagegen in der helladaptierten Phase vor und ist abhängig von  $H^+$ , PsbS, Zeaxanthin und eventuell auch von Lutein.

Die dargestellte Transfereffizienz  $\Phi_{\text{Transfer}}$  zeigt den Energietransfer zwischen Chlorophyllen und Carotinoiden an. Sie wird bestimmt durch den Quotienten der Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung und der Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung.

Bei der Betrachtung der Transfereffizienz in der Dunkelphase vor und nach der Adaption an Licht ergibt sich für alle Pflanzen mit funktionierendem Xanthophyllzyklus die Abnahme der Transfereffizienz und anschließende Erholung auf den Anfangswert. Die Mutanten mit gehemmtem Xanthophyllzyklus zeigen dagegen einen anderen Kurvenverlauf. Dies spiegelt also einen Prozess wider, bei dem die Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung stärker abnimmt als die nach Einphotonenanregung und kann durch Modelle erklärt werden, bei denen durch die Umwandlung von Zeaxanthin zu Violaxanthin der Energietransfer von der Chlorophyllen zu den Carotinoiden zunimmt.

Bei der Betrachtung der Transfereffizienz im helladaptierten Zustand zeigt sich bei fast allen Pflanzen eine Zunahme der Transfereffizienz. Nur die Mutante ohne PsbS besitzt eine konstante Transfereffizienz. Die Zunahme der Transfereffizienz kann sowohl durch eine stärkere Abnahme der Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung als auch durch eine stärkere Zunahme der Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung erklärt werden. Die Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung kann nur dann sehr stark abnehmen, wenn ein sehr großer Anteil der Energie, die von dem entsprechenden Lichtsammelkomplex aufgenommen wurde, sehr effektiv über eine Energiesenke abgeführt wird. Dabei könnte in diesem Prozess die Energie von den Chlorophyllen auf Zeaxanthin übertragen werden. Eine andere Möglichkeit wäre der Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein. Die Messung der *lut2*-Mutante, die kein Lutein enthält, zeigt im helladaptierten Zustand einen kleineren Anstieg der Transfereffizienz. Da in dieser Mutante statt Lutein vermehrt  $\beta$ -Carotin und Xanthophyllcarotinoide vorliegen, könnten die Bindungsstellen von Lutein durch Xanthophyllcarotinoide besetzt sein. Sitzt Violaxanthin statt Lutein in dieser Bindungstasche,

kann keine Energie von den Chlorophyllen zu Violaxanthin transferiert werden, da das  $S_1$ -Niveau von Violaxanthin höher liegt als das  $Q_y$ -Niveau der Chlorophylle. Bei Besetzung der Lutein-Bindungstasche durch Zeaxanthin kann dagegen Energie aus dem  $Q_y$ -Niveau der Chlorophylle zu dem  $S_1$ -Niveau von Zeaxanthin transferiert werden. Dass die Transfereffizienz der *lut2*-Mutante im belichteten Zustand langsamer ansteigt, als die des Wildtyps, könnte durch die Besetzung der Lutein-Bindungsstellen mit Violaxanthin, der dann folgenden enzymatischen Umwandlung zu Zeaxanthin und dem daraus resultierenden Energietransfer erklärt werden. Da Zeaxanthin nicht so gut in die Bindungstasche des Luteins passt, ist der Energietransfer nicht so hoch, wie mit Lutein an der entsprechenden Bindungsstelle. Der Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein würde das Modell der Konformationsänderung in LHCII von Ruban *et al.*<sup>46</sup> unterstützen.

Die Abhängigkeit der Transfereffizienz vom Vorhandensein von PsbS bestätigt die wichtige Funktion dieses Proteins beim nicht-photochemischen Quenching. Dabei könnte die Hypothese unterstützt werden, dass PsbS mit Zeaxanthin ein Quenchingzentrum bildet. Eine andere Hypothese beschreibt PsbS als ein Triggermolekül. Dabei werden durch die Verringerung des pH-Wertes beim Ablauf der Lichtreaktion Seitenketten des PsbS protoniert und so eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt. Dies unterstützt das Modell von Bonente *et al.*<sup>57, 58</sup> Diese Konformationsänderung führt ebenfalls zu einer Konformationsänderung der benachbarten Proteinkomplexe, wie LHCII, welche den verstärkten Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein bewirkt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Modelle eins bis vier, der in der Tabelle 1 aufgeführten Mechanismen, besser das Signal aus dem dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung beschreiben, während durch die Modelle fünf bis acht der Tabelle 1 die Ergebnisse aus dem helladaptierten Zustand erklärt werden können.

Die in den Pflanzen parallel ablaufenden Prozesse beim nicht-photochemischen Quenchen werden durch die Verringerung des pH-Wertes durch die Lichtreaktion aktiviert. Die erhöhte Konzentration von Protonen führt zur Aktivierung des Enzyms Violaxanthin-Deepoxidase, außerdem könnte gleichzeitig eine Konformationsänderung des PsbS oder des LHCII stattfinden, die entweder durch die Veränderung des pH-Wertes oder durch die Entstehung von Zeaxanthin getriggert werden könnte. Durch die Protonierung von Residuen der Proteinstruktur des PsbS, die in das Lumen ragen, könnte eine Konformationsänderung des



PsbS eintreten, welche in benachbarten Lichtsammelkomplexen ebenfalls ein Konformationsänderung induzieren könnte. Die Konformationsänderung des LHCII, die durch eine eventuelle Verdrillung von Neoxanthin entsteht, würde eine Annäherung von Lutein an Chlorophylle bewirken. Diese Abstandsveränderung könnte einen Energietransfer von Chlorophyllen zu Lutein ermöglichen. Da Lutein zehn Doppelbindungen besitzt, liegt das  $S_1$ -Niveau energetisch zwischen denen von Violaxanthin und Zeaxanthin und eine Übertragung von Energie aus dem  $Q_y$ -Niveau der Chlorophylle zu dem  $S_1$ -Niveau von Lutein könnte auftreten. Die von Lutein aufgenommene Energie wird als Wärme aus der Pflanze abgeführt. Die Konformationsänderung des PsbS oder des LHCII reagiert sehr schnell auf die Veränderung des lumenalen pH-Wertes. Dies könnte erklären, wieso dieser Quenchingprozess sofort zu Beginn der Dunkelphase zum Erliegen kommt. Die enzymatische Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin läuft auf einer langsameren Zeitskala ab. Während der Belichtung wird Zeaxanthin an den Bindungsstellen des Violaxanthin gebunden und führt zusätzlich überschüssige Energie, die von den  $Q_y$ -Niveaus der Chlorophylle auf das  $S_1$ -Niveau von Zeaxanthin übertragen wird, als Wärme ab. Dieser Energietransfer von Chlorophyllen zu Zeaxanthin könnte aber auch über die Bildung von Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimeren ablaufen, die eventuell in Zeaxanthin-Radikalkationen zerfallen können. Da Ma *et al.*<sup>28</sup> bei den publizierten Messungen Chlorophylle angeregt und die transiente Absorption vom  $S_1$ -Niveau zum  $S_n$ -Niveau der Carotinoide detektiert haben, dagegen aber bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen unter anderem der  $S_1$ -Zustand der Carotinoide angeregt wurde und die Veränderungen der daraus resultierenden Chlorophyll-Fluoreszenz gemessen wurden, kann die Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimers als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Die Bildung eines solchen Heterodimers würde dazu führen, dass bei Anregung der Chlorophylle der Heterodimere eine Carotinioid-Fluoreszenz zu beobachten ist und auch bei Anregung der Carotinoide der Heterodimere eine Chlorophyll-Fluoreszenz detektierbar ist.

Da die Zeaxanthin-Epoxidase durch einen steigenden pH-Wert aktiviert wird, läuft die Rückbildung von Violaxanthin und Bindung an das Protein auch auf einer langsameren Zeitskala ab. Die Pflanze baut diese Quenchingstelle langsamer ab und wäre so bei Lichtschwankungen schnell wieder in der Lage überschüssige Energie abzuführen. Durch die Veränderungen des pH-Wertes im Lumen der Thylakoide werden zwei verschiedene Quenchingprozesse getriggert, die überlagert ablaufen und auf unterschiedlichen Zeitskalen aktiviert und deaktiviert werden. So kann in der Pflanze eine effektive Anpassung an das

Auftreten von überschüssiger Energie gewährleistet werden. Zusätzlich kann bei einem Ausfall einer der Prozesse die Pflanze trotzdem überschüssige Energie abführen. In der Pflanze entstehen so zwei verschiedene Energiesenken in denen durch Energietransfer von Chlorophyllen zu Carotinoiden überschüssige Energie als Wärme abgeführt wird und so die Reaktionszentren geschützt werden können.

Dieser zweiteilige, konzertierte Mechanismus spiegelt die mit den *Arabidopsis thaliana* Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen gewonnenen Daten wieder. Für den schnelleren nicht-photochemischen Quenching Prozess ist neben dem  $\Delta pH$  und PsbS sowohl Zeaxanthin als auch eventuell Lutein nötig, während der langsamere Prozess von  $\Delta pH$  und der Funktion des Xanthophyllzyklus abhängt.

Das Signal des dunkeladaptierten Zustandes kann durch jedes der vier ersten Modelle beschrieben werden, da diese nur von der Bildung von Zeaxanthin abhängen. Entweder laufen der Energietransfer und damit die Abfuhr der überschüssigen Energie als Wärme durch den energetisch tieferen  $S_1$ -Zustand von Zeaxanthin oder durch die Bildung eines Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimers ab. Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Daten aus Pflanzenmessungen von Wildtyp und Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die durch die kombinierte Ein- und Zweiphotonenanregung des  $S_1$ -Niveau der Chlorophylle und Carotinoide und der Detektion der Chlorophyllfluoreszenz erhalten wurden, kann keiner der Mechanismen eins bis vier ausgeschlossen werden.

Für den helladaptierten Zustand ist eine Abhängigkeit von PsbS postuliert worden. In den vorgestellten Modellen fünf, sieben und acht spielt PsbS eine entscheidende Rolle. Im Modell sieben bindet PsbS Zeaxanthin und bildet so selbst das Quenching-Molekül, während es in den Modellen fünf und acht wegen des sinkenden pH-Wertes eine Konformationsänderung durchläuft und dadurch eine Konformationsänderung des LHCII induziert werden könnte. Die in dieser Arbeit präsentierte Abhängigkeit des Quenchingmechanismus im helladaptierten Zustand von Zeaxanthin, wird nur durch die Modelle sieben und acht beschrieben. Zeaxanthin fungiert im Modell sieben durch die Bindung an PsbS als Quenchingmolekül, während in Modell acht das Quenching im LHCII abläuft und dabei durch Energietransfer von Chlorophyllen zu Zeaxanthin erklärt werden könnte. Die mögliche Abhängigkeit von Lutein, die in dieser Arbeit gezeigt wurde, unterstützt Modell sechs. Dabei wurde eine

## 5 Diskussion

Konformationsänderung des LHCII postuliert, die eine Abstandsveränderung von Chlorophyllen und Lutein induziert und so zum Energietransfer führt. Da die Bindung von Carotinoiden an PsbS umstritten ist, ist es wahrscheinlich, dass PsbS als Trigger fungiert und durch seine Konformationsänderung eine weitere Konformationsänderung im LHCII induziert, welche zur Bildung einer Quenchingstelle im LHCII führen könnte, wie es in Modell acht beschrieben wurde.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit werden die Energietransferprozesse der Pigmente bei der Photosynthese untersucht. Die Experimente werden *in vivo* an *Arabidopsis thaliana* Wildtyp-Pflanzen sowie an Mutanten durchgeführt. Dabei werden die Pflanzen während einer Messung vom dunkeladaptierten in den helladaptierten Zustand gebracht und nach vollständiger Anpassung der Pflanzen an die helle Umgebung wieder eine Dunkeladaption durchgeführt, um so den Ablauf des nicht-photochemischen Quenchens bestimmen zu können.

Bei diesem Regulationsmechanismus zum Schutz der photosynthetisch aktiven Zentren vor überschüssiger Energie spielen vor allem Carotinoide eine entscheidende Rolle. Da die Anregung des für den Regulationsmechanismus wichtigen  $S_1$ -Niveaus der Carotinoide auf Grund der Laporte-Regel optisch verboten ist, kann dieser Zustand nicht mit konventioneller Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht werden. Daher wird durch Zweiphotonenanregung, wobei die Auswahlregeln umgekehrt werden, das  $S_1$ -Niveau der Carotinoide selektiv bevölkert und mittels Detektion der Chlorophyllfluoreszenz, der Einfluss dieses Energieniveaus auf den Energietransfer bestimmt. Außerdem wird zum Vergleich Chlorophylle mittels Einphotonenanregung angeregt und die resultierende Chlorophyllfluoreszenz detektiert. Durch Vergleich der beiden erhaltenen Chlorophyllfluoreszenzen kann die Energietransferrate von Chlorophyllen zu Carotinoiden bei den verschiedenen Lichtbedingungen bestimmt werden. Für diesen Prozess des nicht-photochemischen Quenchens werden in der Literatur viele verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, die verschiedene Carotinoide oder Lichtsammelkomplexe als Quenchingstelle postulieren.<sup>11, 33, 46, 57, 93, 97</sup>

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Messungen von kombinierter Ein- und Zweiphotonenanregung und jeweiliger Detektion der Chlorophyllfluoreszenz an Pflanzenblättern können neue Einblicke in nicht-photochemischen Quenchingprozesse gewonnen werden. Entscheidend ist dabei die Untersuchung sowohl von Wildtyp-Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, als auch die Untersuchung verschiedener *Arabidopsis thaliana* Mutanten. Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten sind entweder in der enzymatischen Umwandlung von Violaxanthin zu Zeaxanthin (*npq1*-Mutante) oder umgekehrt (*npq2*-Mutante) gehemmt, so dass der Xanthophyllzyklus bei diesen Mutanten nicht ablaufen kann, um so den Einfluss dieses Zyklus auf das nicht-photochemische Quenchen zu bestimmen.

Andere Mutanten haben eine Hemmung in der Carotinoidbiosynthese, so dass das Carotinoid Lutein (*lut2*-Mutante) nicht synthetisiert werden konnte. Da dieses Carotinoid in sehr hoher Konzentration in Pflanzen vorliegt, wird eine mögliche Beteiligung von Lutein beim nicht-photochemischen Quenchen in der Literatur postuliert. Die dritte in die Untersuchungen eingebundene Mutationsspezies besitzt eine Hemmung (*npq4*-Mutante) oder Verstärkung (*wt+PsbS*-Mutante) in der Synthese einer Untereinheit des Photosystems II (PsbS). Die Rolle des PsbS in der Photosynthese ist noch unklar, da es bis jetzt noch nicht gelungen ist die vollständige Struktur und Lage diese Proteinkomplexes aufzuklären. Die verwendeten Mutanten sind in der Literatur bekannt und vollständig charakterisiert.

Diese Messungen an Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen deuten daraufhin, dass nicht-photochemisches Quenchen in zwei unterschiedlich schnellen Prozessen abläuft, die von verschiedenen Carotinoiden und Proteinkomplexen abhängt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die ermittelte Transfereffizienz gut mit den in der Literatur postulierten Mechanismen korreliert und als ein Maß für nicht-photochemisches Quenchen genutzt werden kann.

Der schnellere Prozess des nicht-photochemisches Quenchen ist abhängig von  $\Delta\text{pH}$ , PsbS, Zeaxanthin und eventuell auch Lutein. Das Absinken des pH-Wertes könnte eine Konformationsänderung des PsbS bedingen, was eine weitere Konformationsänderung in LHCII bewirken würde. Diese führt zu einem erhöhten Energietransfer von Chlorophyllen zu Carotinoiden. Die überschüssige Energie wird von den Carotinoiden als Wärme aus der Pflanze abgeführt. Der langsamere Quenchingprozess ist dagegen abhängig von  $\Delta\text{pH}$  und Zeaxanthin. Durch die erhöhte Protonenkonzentration wird das Enzym Violaxanthin-deepoxidase des Xanthophyllzyklus aktiviert und Zeaxanthin statt Violaxanthin im LHCII gebunden. Da das  $S_1$ -Niveau von Zeaxanthin durch das größere konjugierte  $\pi$ -System im Vergleich zu Violaxanthin energetisch tiefer liegt, kann ein Energietransfer von den Chlorophyllen zu dem  $S_1$ -Niveau von Zeaxanthin stattfinden. Die so aufgenommene Energie wird ebenfalls als Wärme aus der Pflanze abgeführt. Außerdem könnte auch ein Zeaxanthin-Chlorophyll-Heterodimer gebildet werden, der zu einem Zeaxanthin-Radikalkation zerfällt oder als Heterodimer die überschüssige Energie aus den Pflanzen abführt. Der Regulationsmechanismus zum Schutz der Pflanze vor überschüssiger Energie läuft wahrscheinlich in zwei verschiedenen Prozessen ab, die in verschiedenen Zeitskalen aktiviert und deaktiviert werden und so einen sehr effektiven Schutzmechanismus für die Pflanze darstellen könnten.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wäre es sinnvoll, ähnliche *in vivo* Messungen mit Doppelmутanten von *Arabidopsis thaliana* durchzuführen. Diese sollten sowohl eine Hemmung des Xanthophyllzyklus als auch eine Hemmung in der Synthese von Lutein oder PsbS besitzen. So könnten beide Prozesse des Regulationsmechanismus gleichzeitig in einer Pflanze unterbunden werden und ein Ausbleiben des Quenchings nachgewiesen werden. Außerdem wären Experimente mit *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die eine erhöhte Konzentration von Lutein besitzen zweckmäßig, um die Abhängigkeit des Prozesses im helladaptierten Zustand von Lutein beurteilen zu können. Auch Messungen von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit Mutationen an verschiedenen Chlorophyllen des LHCII, wodurch die Wechselwirkungen von Chlorophyllen mit Carotinoiden gestört werden, könnten Aufschluss über die möglichen Quenchingprozesse geben.

## 7 Literatur

1. Blankenship, R. E., *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell Science: Oxford, 2002.
2. C., P. G.; Govindjee, *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer: Dordrecht, 2004; Vol. 19.
3. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*. 5. ed.; W.H. Freeman and Company: New York, 2002.
4. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parkre, J., *Brock Biology of Microorgansims*. Tenth ed.; Prentice Hall: New Jersey, 2003.
5. Dekker, J. P.; Boekema, E. J., Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **2005**, 12 - 39.
6. Duysens, L. N. M., The discovery of the two photosynthetic systems: a personal account. *Photosynth. Res.* **1989**, 21, 61 -79.
7. Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H. T.; Klukas, O.; Saenger, W.; Krauss, N., Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **2001**, 411, (6840), 909-917.
8. Hankamer, B.; Nield, J.; Zheleva, D.; Boekema, E. J.; Jansson, S.; Barber, J., Three-Dimensional Structure of the Photosystem II Core Dimer of Higher Plants Determined by Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **2001**, 135, 262 - 269.
9. Loll, B.; Kern, J.; Saenger, W.; Zouni, A.; Biesiadka, J., Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature* **2005**, 438, 1040 - 1044.
10. Loll, B.; Kern, J.; Zouni, A.; Saenger, W.; Biesiadka, J.; K.-D., I., The Antenna System of Photosystem II From *Thermosynechococcus elongatus* at 3.2 Å Resolution. *Photosynth. Res.* **2005**, 86, 175 - 184.
11. Standfuss, J.; van, A. C. T.; Scheltinga; Lamborghini, M.; Kühlbrandt, W., Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light harvesting complex at 2.5Å resolution. *The EMBO Journal* **2005**, 24, 919–928.
12. Yamamoto, H. Y.; Nakayama, T. O. M.; Chichester, C. O., Studies on the Light and Dark Interconversion of Leaf Xanthophylls. *Biochem. Biophys.* **1962**, 97, 168 - 173.
13. Liu, Z.; Wang, K.; Kuang, T.; Zhang, J.; Gui, L.; An, X.; Chang, W., Crystal Structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* **2004**, 428, 287-292.

14. Polívka, T.; Sundström, V., Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States-From Solution to Natural and Artificial Systems. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2021-2071.
15. Nield, J.; Funk, C.; Barber, J., Supramolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein. *Phil. Trans.R. Soc. Lond. B* **2000**, 355, 1337 - 1344.
16. Nield, J.; Orlova, E. V.; Morris, E. P.; Gowen, B.; van Heel, M.; Barber, J., 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nature Structural Biology* **2000**, 7, (1), 44 - 47.
17. Wehling, A. *Zweiphotonenuntersuchungen zur Rolle von Carotinoiden in der Regulation der Photosynthese*; TU Braunschweig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie: Braunschweig, 2006.
18. Demmig-Adams, B.; Adams, W. W., Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* **2002**, 298, 2149-2153.
19. Pogson, B.; McDonald, K. A.; Truong, M.; Britton, G.; DellaPenna, D., Arabidopsis carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants. *The Plant Cell* **1996**, 8, 1627 - 1639.
20. Häder, D.-P., *Photosynthese*. Thieme: 1999.
21. Haken, H.; Wolf, H. W., *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer Verlag: Berlin, 1994; Vol. 2.
22. Walla, P. J.; Linden, P. A.; Ohta, K.; Fleming, G. R., Excited-state kinetics of the carotenoid S-1 state in LHC II and two-photon excitation spectra of lutein and beta-carotene in solution: Efficient car S-1 -> Chl electronic energy transfer via hot S-1 states? *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, 106, (10), 1909-1916.
23. Walla, P. J.; Yom, J.; Krueger, B. P.; Fleming, G. R., Two-photon excitation spectrum of light-harvesting complex II and fluorescence upconversion after one- and two-photon excitation of the carotenoids. *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, 104, (19), 4799-4806.
24. Frank, H. A.; A, C.; Chynwat, V.; Young, A.; Gosztola, D.; Wasielewski, M. R., Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **1994**, 41, 389-395.
25. Wehling, A.; Walla, P. J., A Two-Photon Excitation Study on the Role of Carotenoid Dark States in the Regulation of Plant Photosynthesis. *Photosynthesis Research* **2006**, 90, (2), 101-110.



26. Polívka, T.; Zigmantas, D.; Sundström, V.; Formaggio, E.; Cinque, G.; Bassi, R., Carotenoid S1 state in a recombinant light-harvesting complex of photosystem II. *Biochemistry* **2002**, 41, 439-450.
27. Dreuw, A.; Wormit, M., Simple replacement of violaxanthin by zeaxanthin in LHC-II does not cause chlorophyll fluorescence quenching. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2008**, 102, 458 - 465.
28. Ma, Y. Z.; Holt, N. E.; Li, X. P.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R., Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (8), 4377-4382.
29. Morosinotto, T.; Caffari, S.; L, D. O.; Bassi, R., Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol. Plant.* **2003**, 119, 347 - 354.
30. Johnson, M. P.; Davison, P. A.; Ruban, A. V.; Horton, P., The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **2008**, 582, 262 - 266.
31. Demmig-Adams, B.; Adams, W. W., Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1992**, 43, 599-626.
32. Müller, P.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K., Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* **2001**, 125, 1558–1566.
33. Holt, N. E.; Fleming, G. R.; Niyogi, K. K., Toward an understanding of the Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants. *Biochemistry* **2004**, 43, (26), 8281 - 8289.
34. Demmig-Adams, B., Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1020, 1-24.
35. Gilmore, A. M., Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plant.* **1997**, 99, 197-209.
36. Demmig-Adams, B.; Adams, W. W., The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **1996**, 1, 21-26.
37. Gilmore, A. M.; Shinkarev, V. P.; Theodore L. Hazlett; Govindjee, Quantitative Analysis of the Effects of Intrathylakoid pH and Xanthophyll Cycle Pigments on Chlorophyll a Fluorescence Lifetime Distributions and Intensity in Thylakoids. *Biochemistry* **1998**, 37, 13582-13593.
38. Havaux, M.; Dall'Osto, L.; Cuine, S.; Giuliano, G.; Bassi, R., The Effect of Zeaxanthin as the Only Xanthophyll on the Structure and Function of the Photosynthetic

- Apparatus in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (14), 13878–13888.
39. Bode, S.; Quentmeier, C. C.; Liao, P.-N.; Barros, T.; Walla, P. J., Xanthophyll-cycle dependent changes in the energy transfer between carotenoid dark states and chlorophylls in LHC II and living plants. *Chemical Physics Letters* **2007**, in press.
  40. Bassi, R.; Caffari, S., Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynth. Res.* **2000**, 64, 243 - 256.
  41. Havaux, M.; Niyogi, K. K., The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *PNAS* **1999**, 96, 8762 - 8767.
  42. Horton, P.; Ruban, A. V.; Walters, R. G., Regulation of Light Harvesting in Green Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, 47, 655-684.
  43. Niyogi, K. K., Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1999**, 50, 333 - 359.
  44. Dall'Osto, L.; Lico, C.; Alric, J.; Guiliano, G.; Havaux, M.; Bassi, R., Lutein is needed for efficient chlorophyll triplet quenching in the major LHCII antenna complex of higher plants and effective photoprotection *in vivo* under strong light. *BMC Plant Biology* **2006**, 6, 1-20.
  45. Yan, H.; Zhang, P.; Wang, C.; Liu, Z.; Chang, W., Two lutein molecules in LHCII have different conformations and functions: Insight into the molecular mechanism of thermal dissipation in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 355, 457 - 463.
  46. Ruban, A. V.; Berera, R.; Iliaia, C.; van Stokkum, I. H. M.; Kennis, J. T. M.; Pascal, A. A.; van Amerongen, H.; Horton, P.; van Grondelle, R., Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants. *Nature* **2007**, 450, 575 - 579.
  47. Kloppstecher, K.; Montané, M.-H., The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene* **2000**, 258, (1 - 8).
  48. Funk, C.; Schroder, W. P.; Napiwotzki, A.; Tjus, S. E.; Renger, G.; Andersson, B., The PSII-S Protein of Higher Plants - a New Type of Pigment-Binding Protein. *Biochemistry* **1995**, 34, (35), 11133-11141.
  49. Funk, C.; Adamska, I.; Green, B. R.; Andersson, B.; Renger, G., The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 30141-30147.

50. Hankamer, B.; Barber, J.; Boekema, E. J., Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1997**, 48, 641 - 671.
51. Bergantino, E.; Segalla, A.; Brunetta, A.; Teardo, E.; Rigoni, F.; Giacometti, G. M.; Szabo, I., Light- and pH-dependent structural changes in the PsbS subunit of photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, 100, 15265 - 15270.
52. Dominici, P.; Caffari, S.; Armenante, F.; Ceoldo, S.; Crimi, M.; Bassi, R., Biochemical properties of the PsbS subunit of photosystem II either purified from chloroplast or recombinant. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 22750 - 22758.
53. Li, X.; Björkman, O.; Shih, C.; Grossman, A.; Rosenquist, M.; SJansson; Niyogi, K., A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* **2000**, 403, 391–395.
54. Aspinall-O'Dea, M.; Wentworth, M.; Pascal, A.; Robert, B.; Ruban, A.; Horton, P., In vitro reconstitution of the activates zeaxanthin state associated with energy dissipation in plants. *PNAS* **2002**, 99, (25), 16331 - 16335.
55. Ruban, A. V.; Pascal, A. A.; Robert, B.; Horton, P., Activation of Zeaxanthin Is an Obligatory Event in the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 7785 - 7789.
56. Niyogi, K. K.; Shih, C.; Chow, W. S.; Pogson, B.; DellaPenna, D.; Björkman, O., Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth. Res.* **2001**, 67, 139 - 145.
57. Bonente, G.; Howes, B. D.; Caffari, S.; Smulevich, G.; Bassi, R., Interactions between the Photosystem II Subunit PsbS and Xanthophylls Studied *in Vivo* and *in Vitro*. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, (13), 8434 - 8445.
58. Horton, P.; Ruban, A. V.; Wentworth, M., Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. *Phil. Trans.R. Soc. Lond. B* **2000**, 355, 1361 - 1370.
59. Li, X. P.; Phippard, A.; Pasari, J.; Niyogi, K. K., Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo*. *Funct. Plant. Biol.* **2002**, 29, 1131 - 1139.
60. Krause, G. H.; Weis, E., Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* **1991**, 42, 313 - 349.
61. Schreiber, U., Chlorophyll Fluorescence yield changes as a tool in plant physiology: I. The measuring system. *Photosynth. Res.* **1983**, 4, 361 - 373.
62. Krause, G. H.; Weis, E., Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology: II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.* **1984**, 5, 139 - 157.

63. Krause, G. H.; Jahns, P., Non-photochemical energy dissipation determined by Chlorophyll Fluorescence Quenching: Characterization and Function. In *Chlorophyll a Fluorescence*, Papageorgiou, G. C., Govindjee, Ed. Springer: The Netherlands, 2004; Vol. 19, pp 463 - 495.
64. Kalituho, L.; Beran, K. C.; Jahns, P., The transiently generated nonphotochemical quenching of excitation energy in *Arabidopsis* leaves is modulated by zeaxanthin. *Plant Physiology* **2007**, 143, 1861 - 1870.
65. Li, X. P.; Gilmore, A. M.; Niyogi, K. K., Molecular and Global Time-resolved Analysis of a psbS Gene Dosage Effect on pH- and Xanthophyll Cycle-dependent Nonphotochemical Quenching in Photosystem II. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 33590 - 33597.
66. Schanzker, G.; Tóth, S.; Strasser, R. J., dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, 1757, 787 - 797.
67. Aro, E. M.; Virgin, I.; Andersson, B., Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* **1993**, 1143, 113 - 134.
68. Jahns, P.; Miescher, B., Kinetic correlation of recovery from photoinhibition and zeaxanthin epoxidation. *Planta* **1996**, 198, 202 - 210.
69. van Grondelle, R.; Gobets, B., Transfer and Trapping of Excitations in Plant Photosystems. In *Chlorophyll a Fluorescence*, Govindjee, Ed. Springer: The Netherlands, 2004; Vol. 19, pp 108 - 132.
70. Förster, T., Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* **1948**, 2, 55–75.
71. Dexter, D. L., A Theory of Sensitized Luminescence in Solids. *Journal of Chemical Physics* **1953**, 21, (5), 834-850.
72. Nagae, H.; Kakitani, T.; Katoh, T.; Mimuro, M., Calculation of the excitation transfer matrix elements between the S<sub>2</sub> or S<sub>1</sub> state of carotenoid and the S<sub>2</sub> or S<sub>1</sub> state of bacteriochlorophyll. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, (10), 8012-8023.
73. Damjanovic, A.; Ritz, T.; Schulten, K., Energy transfer between carotenoids and bacteriochlorophylls in light-harvesting complex II of purple bacteria. *Physical Review E* **1999**, 59, (3 PTB), 3293-3311.

74. Pigliucci, M., Ecology and Evolutionary Biology of Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book*, Somerville, C. R.; Meyerowitz, E. M., Eds. American Society of Plant Biologists: Rockville, 2002.
75. Niyogi, K. K.; Grossman, A. R.; Björkman, O., Arabidopsis mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* **1998**, 10, 1121-1134.
76. Pogson, B. J.; Niyogi, K. K.; Björkman, O.; DellaPenna, D., Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and nonphotochemical quenching in Arabidopsis mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 13324 - 13329.
77. Li, X.-P.; Müller-Moulé, P.; Gilmore, A. M.; Niyogi, K. K., PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *PNAS* **2002**, 99, (23), 15222 - 15227.
78. Kautsky, H.; Hirsch, A., Neue Versuche zur Kohlensäureassimilation. *Die Naturwissenschaften* **1931**, 19, 964.
79. Lichtenthaler, H. K.; Buschmann, C.; Knapp, M., How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio  $R_{fd}$  of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* **2005**, 43, (3), 379-393.
80. Roháček, K., Chlorophyll fluorescence parameters: the Definition, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **2002**, 40, (1), 13-29.
81. Coherent, I., *Vitesse Duo Laser Operator's Manual*. 2004.
82. Demtroder, W., *Laserspektroskopie: Grundlagen und Techniken*. 5 ed.; Springer-Verlag: New York, 2007.
83. Bode, S. *Zwei-Photonen-Untersuchungen von photosynthetisch relevanten Carotinoiden*; TU Braunschweig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie: Braunschweig, 2006.
84. Bass, M.; van Stryland, E. W.; Williams, D. R.; Wolfe, W. L., *Handbook of Optics: Devices, Measurements & Properties*. Optical Society of America: New York, 1995; Vol. 2.
85. Meschede, D., *Optik, Licht und Laser*. Teubner: Wiesbaden, 2005.
86. Coherent, I., *RegA Model 9000 Laser Operator's Manual*. 1997.
87. Coherent, I., *Optical Parametric Amplifier Operator's Manual*. 1994.
88. Papageorgiou, G. C., Govindjee, *Advances in Photosynthesis and Respiration: Chlorophyll a Fluoreszenz*. Springer: 2004; Vol. 19, p 43-63.

89. Lakowitz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third ed.; Springer: Baltimore, 2006.
90. Li, X. P.; Gilmore, A. M.; Caffari, S.; Bassi, R.; Golan, T.; Kramer, D.; Niyogi, K. K., Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH Sensing by the PsbS Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, 22866 - 22874.
91. Frank, H. A.; Bautista, J. A.; Josue, J. S.; Young, A. J., Mechanism of Nonphotochemical Quenching in Green Plants: Energies of the Lowest Excited Singlet States of Violaxanthin and Zeaxanthin. *Biochemistry* **2000**, 39, 2831-2837.
92. Holt, N. E.; Zigmantas, D.; Valkunas, L.; Li, X.-P.; Niyogi, K. K.; Fleming, G. R., Carotenoid Cation Formation and the Regulation of Photosynthetic Light Harvesting. *Science* **2005**, 307, 433-436.
93. Ahn, T. K.; Avenson, T. J.; Ballottari, M.; Cheng, Y.-C.; Niyogi, K. K.; Bassi, R.; Fleming, G. R., Architecture of a Charge-Transfer State Regulating Light Harvesting in a Plant Antenna Protein. *Science* **2008**, 320, 794 - 797.
94. Dreuw, A.; Fleming, G. R.; Head-Gordon, M., Charge-transfer state as a possible signature of a zeaxanthin-chlorophyll dimer in the non-photochemical quenching process in green plants. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107, (27), 6500-6503.
95. Avenson, T. J.; Ahn, T. K.; Zigmantas, D.; Niyogi, K. K.; Li, Z.; Ballottari, M.; Bassi, R.; Fleming, G. R., Zeaxanthin Radical Cation Formation in Minor Light-harvesting Complexes of Higher Plant Antenna. *The Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 3550 - 3558.
96. Dreuw, A.; Fleming, G. R.; Head-Gordon, M., Chlorophyll fluorescence quenching by xanthophylls. *PhysChemChemPhys* **2003**, 5, 3247 - 3256.
97. Pascal, A. A.; Liu, Z.; Broess, K.; Oort, B. v.; Amerongen, H. v.; Wang, C.; Horton, P.; Robert, B.; Chang, W.; Ruban, A., Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* **2005**, 436, 134-137.
98. Moya, I.; Silverstri, M.; Vallon, O.; Cinque, G.; Bassi, R., Time-Resolved Fluorescence Analysis of the Photosystem II Antenna Proteins in Detergent Micelles and Liposomes. *Biochemistry* **2001**, 40, 12552-12561.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BBO	Beta-Barium-Borat
Cab	Chlorophyll a/b-bindend
CP	Chlorophyll bindende Proteine
cw	kontinuierlicher Laserstrahl
IC	Internal Conversion
ISC	Intersystem Crossing
FD	Ferredoxin
FNR	Ferredoxin-NADP <sup>+</sup> -Reduktase
F <sup>OPE</sup>	Chlorophyll a Fluoreszenz nach Einphotonenanregung
F <sup>TPE</sup>	Chlorophyll a Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung
fs	Femtosekunden
HOMO	highest occupied molecule orbital
LBO	LiB <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
LHCI	Lichtsammelkomplexe I
LHCII	Lichtsammelkomplexe II
LUMO	lowest unoccupied molecule orbital
<i>lut2</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> , die keine Lutein enthält
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NDM	dispersiver dielektrischer Spiegel
Nd:YVO	Neodym:Yttrium-Vanadat
NPQ	non-photochemical quenching
<i>npq1</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> , die kein Zeaxanthin synthetisiert
<i>npq2</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> , die kein Violaxanthin herstellt
<i>npq4</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> , die keine PsbS akkumuliert
NPQ <sub>OPE</sub>	berechneter NPQ- Faktor der Einphotonenanregung
NPQ <sub>TPE</sub>	berechneter NPQ- Faktor der Zweiphotonenanregung
OPA	Optical Parametric Amplifier
OPE	one photon excitation, Einphotonenanregung

## 8 Abkürzungsverzeichnis

P680	Reaktionszentrum im Photosystem II
P700	Reaktionszentrum im Photosystem I
PC	Plastocyanin
PQ	Plastoquinon
PQH <sub>2</sub>	Plastoquinol
ps	Picosekunden
PsbS	S-Untereinheit des Photosystems II
PSII	Photosystem II
PSI	Photosystem I
RegA	Regenerative Amplifier
TA	transiente Absorption
TPE	two photon excitation, Zweiphotonenanregung
VDE	Violaxanthin-Deepoxidase
VPUF	Verdi-Pumped Ultra Fast
wt	Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>wt+PsbS</i>	Mutante von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit angereichertem PSbS-Gehalt



## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2 - 1: Schematischer Aufbau eines Chloroplasten .....	4
Abbildung 2 - 2: Querschnitt durch die Thylakoidmembran mit den für die Lichtreaktion benötigten Proteine.....	5
Abbildung 2 - 3: Energieschema der Elektronentransportkette während der Lichtreaktion .....	5
Abbildung 2 - 4: Der Calvin-Zyklus .....	9
Abbildung 2 - 5: Darstellung des monomeren PSI-Komplex .....	12
Abbildung 2 - 6: Darstellung des PSII-Dimers in der Seitenansicht.....	15
Abbildung 2 - 7: Darstellung des Lichtsammelkomplex II -Trimer .....	17
Abbildung 2 - 8: Schematische Aufsicht auf den PSII-LHCII-Superkomplex .....	17
Abbildung 2 - 9: Strukturformel der Chlorophylle, A: Chlorophyll a, B: Chlorophyll b .....	20
Abbildung 2 - 10: links: Absorptionsspektrum der Chlorophylle a und b, rechts: vereinfachtes Energieniveauschema des Chlorophyll a. ....	21
Abbildung 2 - 11: Fluoreszenzspektrum der Chlorophylle a und b in Diethylether. ....	21
Abbildung 2 - 12: Biosynthese der Xanthophylle .....	23
Abbildung 2 - 13: links: Absorptionsspektrum von Chlorophyll a, Chlorophyll b und $\beta$ -Carotin, rechts: vereinfachtes Energieniveauschema der Carotinoide.....	24
Abbildung 2 - 14: Energieniveau-Schema der angeregten Zustände von Carotinoiden und Chlorophyllen mit den möglichen Energieübertragungswegen, ET2 und ET1. ....	25
Abbildung 2 - 15: Enzymatischer Ablauf des Xanthophyll-Zyklus.....	26
Abbildung 2 - 16: Abbauwege von angeregten Chlorophyllmolekülen. ....	28
Abbildung 3 - 1: Schematische Darstellung einer gesamten PAM-Messung (unten) und in der Vergrößerung während des belichteten Zustands (oben) .....	38
Abbildung 3 - 2: Schematischer Aufbau des Lasersystems der Firma Coherent.....	41
Abbildung 3 - 3: Schematischer Aufbau des Vitesse-Duo.....	42
Abbildung 3 - 4: Schematischer Aufbau des RegA 9000 .....	44
Abbildung 3 - 5: Schematischer Aufbau des OPA 9400.....	46
Abbildung 3 - 6: Schematischer Aufbau zur Fluoreszenzmessung durch einen konofokalen Aufbau und integriertem PAM.....	48

Abbildung 4 - 1: Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide .....	52
Abbildung 4 - 2: Verlauf der Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung der Chlorophylle.....	53
Abbildung 4 - 3: Kombiniertes Diagramm der Chlorophylle nach Ein- (schwarze Kurve) und Zweiphotonenanregung (rote Kurve) .....	53
Abbildung 4 - 4: Diagramm der Transfereffizienz des Wildtyps von <i>Arabidopsis thaliana</i> im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung mit aktinischem Licht.....	55
Abbildung 4 - 5: Diagramm des nicht-photochemischen Quenchingparameters für die Ein- (schwarze Kurve) und Zweiphotonenanregung (rote Kurve).....	56
Abbildung 4 - 6: Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Xanthophyll-Mutanten.....	57
Abbildung 4 - 7: Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Xanthophyll-Mutanten.....	58
Abbildung 4 - 8: Abbildung der absoluten Transfereffizienz für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Xanthophyll-Mutanten .....	59
Abbildung 4 - 9: Darstellung des NPQ-Parameters nach Einphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Xanthophyll-Mutanten.....	60
Abbildung 4 - 10: Darstellung des NPQ-Parameters nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Xanthophyll-Mutanten.....	60
Abbildung 4 - 11: Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt.....	62
Abbildung 4 - 12: Chlorophyllfluoreszenz nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt.....	62
Abbildung 4 - 13: Darstellung der absoluten Transfereffizienz für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt .....	63
Abbildung 4 - 14: Darstellung der NPQ-Parameter nach Einphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt.....	64
Abbildung 4 - 15: Darstellung der NPQ-Parameter nach Zweiphotonenanregung für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt.....	64
Abbildung 4 - 16: Absolute Fluoreszenzintensitäten der Ein- (schwarze Punkte) und Zweiphotonenanregung (rote Punkte) für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>npq1</i> - und <i>npq2</i> -Mutanten .....	65

Abbildung 4 - 17: Absolute Fluoreszenzintensitäten der Ein- (schwarze Punkte) und Zweiphotonenanregung (rote Punkte) für Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>npq4-</i> , <i>lut2-</i> und <i>wt+PsbS</i> -Mutanten.....	66
Abbildung 5 - 1: Fluoreszenzspektren von dunkeladaptierten Schilfblättern a) Chlorophyllfluoreszenz nach Einphotonenanregung der Chlorophylle und b) Fluoreszenzspektren nach Zweiphotonenanregung der Carotinoide .....	69
Abbildung 5 - 2: Molecular Gear Shift Modell.....	70
Abbildung 5 - 3: a und c: Die transiente Absorptionskinetiken im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand bei verschiedenen Anregungswellenlängen. b und d: Differenz Kurve aus belichteten und unbelichtetem Zustand mit jeweiligem monoexponentielle Fit (rote Kurve) und den entsprechenden Lebensdauern.....	71
Abbildung 5 - 4: Die skalierten transiente Absorptionskinetiken von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand. ....	72
Abbildung 5 - 5: Die skalierten transiente Absorptionskinetiken von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp und Mutanten mit verändertem Xanthophyll-Zusammensetzung im belichteten (grüne Kurve) und unbelichteten (schwarze Kurve) Zustand. ....	73
Abbildung 5 - 6: oben: Transiente Absorptionsdaten von Spinat Thylakoiden im belichteten (Kreise) und unbelichteten (Dreiecke) Zustand mit den jeweiligen Fits. unten: Kurve aus der Differenz von belichtetem und unbelichtetem Zustand mit zugehörigem Fit.....	74
Abbildung 5 - 7: Rekonstruiertes Absorptionsspektrum (Linie mit Kreisen) erhalten durch die Differenz von Daten aus dem belichteten Zustand mit Daten aus dem unbelichteten Zustand. Das Spektrum des $\beta$ -Carotin-Radikalkations aus dem O <sub>2</sub> -entwickelten <i>Synechocystis</i> PSII-Kernkomplex bei 20 K ist als gestrichelte Linie dargestellt. ....	75
Abbildung 5 - 8: Schematische Darstellung des Mechanismus zur Bildung eine Zeaxanthin-Radikalkations. 1: Energietransfer der Pool-Chlorophylle zum Heterodimer, 2: Relaxation des angeregten Heterodimers zu Chlorophyll-Radikalanion und Zeaxanthin-Radikalkation, 3: Ladungsrekombination zum nicht-angeregten Heterodimer. ....	76
Abbildung 5 - 9: Durch das höher gelegene S <sub>1</sub> -Niveau von Violaxanthin wird Energie von Violaxanthin zu den Chlorophyllen transferiert (dünner roter Pfeil). Durch Bindung des unpolaren Zeaxanthin in der Bindungstasche entsteht eine stärkere Bindung und die	

Absenkung des $S_1$ -Niveaus durch das größere $\pi$ -System bewirkt einen Energietransfer von den Chlorophyllen zu Zeaxanthin. ....	78
Abbildung 5 - 10: Fluoreszenzabklingkurven von LHCII-Trimeren (blau) und LHCII-Kristallen (rot).....	79
Abbildung 5 - 11: a,b: Niedrigtemperatur Fluoreszenz Spektren von LHCII in Kristallen (a, rot) und Trimeren (b, blau) und zweiten Derivaten (schwarz). c, d: Resonanz Raman Spektren von Neoxanthin (c) und Chlorophyll b (d) in Kristallen (rot) und Trimern (blau). Differenz der Spektren von Kristallen minus Trimere (d, schwarz) .....	80
Abbildung 5 - 12: a: Resonanz Raman Spektren von <i>Arabidopsis thaliana</i> Wildtyp Chloroplasten im belichteten (blau) und unbelichteten (rot) Zustand. b: Differenz der Raman Spektren aus a (grün) und im Vergleich ein Raman Spektrum (schwarz) von LHCII im belichteten Zustand. c: Das Verhältnis von $953\text{ cm}^{-1}/964\text{ cm}^{-1}$ zu qE bei verschiedenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten mit verändertem PsbS Gehalt. d: Veränderungen der relativen Raman Intensität bei $953\text{ cm}^{-1}$ von LHCII bei verschieden starkem Quenching.....	82
Abbildung 5 - 13: Modell zur Veranschaulichung der Konformationsänderung und des dadurch entstehenden Quenchings. ....	83
Abbildung 5 - 14: Darstellung der NPQ-Parameter für <i>lut2</i> - (A, B) und <i>npq1</i> -Mutanten (C, D) im Vergleich mit den jeweiligen Doppelmutanten <sup>57</sup> .....	84
Abbildung 5 - 15: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit Hemmungen des Xanthophyllzyklus im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung.....	89
Abbildung 5 - 16: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt oder Hemmung in der Lutein Synthese im dunkeladaptierten Zustand vor und nach der Belichtung.....	91
Abbildung 5 - 17: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit Hemmungen des Xanthophyllzyklus im helladaptierten Zustand.....	92
Abbildung 5 - 18: Darstellung der Transfereffizienz bei Wildtyp von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Mutanten mit verändertem PsbS-Gehalt oder Hemmung in der Lutein Synthese im helladaptierten Zustand .....	93

## 10 Anhang

### NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 07, 2008

This is a License Agreement between Claudia Quentmeier ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1983680823143
License date	Jul 07, 2008
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting
Licensed content author	Andrew A. Pascal, Zhenfeng Liu, Koen Broess, Bart van Oort, Herbert van Amerongen, Chao Wang, Peter Horton, Bruno Robert, Wenrui Chang, Alexander Ruban
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2005
Portion used	Figures / tables
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
PO Number	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

#### Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation

of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],  
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL  
ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication).

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

v1.1

# **NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS**

Jul 08, 2008

This is a License Agreement between Claudia Quentmeier ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1984101056821
License date	Jul 08, 2008
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	Nature
Licensed content title	Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants
Licensed content author	Alexander V. Ruban, Rudi Berera, Cristian Illoaia, Ivo H. M. van Stokkum, John T. M. Kennis, Andrew A. Pascal, Herbert van Amerongen, Bruno Robert, Peter Horton, Rienk van Grondelle
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2007
Portion used	Figures / tables
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
High-res requested	No
PO Number	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

## Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission

must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],  
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL  
ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication).

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

v1.1



# **NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE TERMS AND CONDITIONS**

Jul 08, 2008

This is a License Agreement between Claudia Quentmeier ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Nature Publishing Group, and the payment terms and conditions.

License Number	1984101402910
License date	Jul 08, 2008
Licensed content publisher	Nature Publishing Group
Licensed content publication	The EMBO Journal
Licensed content title	Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å... resolution
Licensed content author	Jürg Standfuss, Anke C Terwisscha van Scheltinga, Matteo Lamborghini, Werner Kuhlbrandt
Volume number	
Issue number	
Pages	
Year of publication	2005
Portion used	Figures / tables
Requestor type	Student
Type of Use	Thesis / Dissertation
PO Number	
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

## Terms and Conditions for Permissions

Nature Publishing Group hereby grants you a non-exclusive license to reproduce this material for this purpose, and for no other use, subject to the conditions below:

1. NPG warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to Nature Publishing Group and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version). If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted by NPG with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.
2. Permission granted free of charge for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to the work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version. Where print permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional, electronic re-use (unless, as in the case of a full paper, this has already been accounted for during your initial request in the calculation

of a print run). NB: In all cases, web-based use of full-text articles must be authorized separately through the 'Use on a Web Site' option when requesting permission.

3. Permission granted for a first edition does not apply to second and subsequent editions and for editions in other languages (except for signatories to the STM Permissions Guidelines, or where the first edition permission was granted for free).
4. Nature Publishing Group's permission must be acknowledged next to the figure, table or abstract in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figure/table/abstract, and must be hyperlinked to the journal's homepage.
5. The credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

For AOP papers, the credit line should read:

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME],  
advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL  
ACRONYM].XXXXX)

6. Adaptations of single figures do not require NPG approval. However, the adaptation should be credited as follows:

Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication)

7. Translations of 401 words up to a whole article require NPG approval. Please visit <http://www.macmillanmedicalcommunications.com> for more information. Translations of up to a 400 words do not require NPG approval. The translation should be credited as follows:

Translated by permission from Macmillan Publishers Ltd: [JOURNAL NAME]  
(reference citation), copyright (year of publication).

We are certain that all parties will benefit from this agreement and wish you the best in the use of this material. Thank you.

v1.1

## Copyright Permission Policy

### **ASBMB Journals**

*Journal of Biological Chemistry*  
*Molecular and Cellular Proteomics*  
*Journal of Lipid Research*  
*ASBMB Today*

**ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:**

- The Journal of Biological Chemistry is copyrighted by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. ASBMB grants use without requiring your copyright permission request for: Original authors wanting to reproduce figures or tables from their own work to publish in not-for-profit formats or venues, provided that full acknowledgment of the source is provided in the new work.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.
- Reproduction or republication of abstracts only.
- Photocopying up to 5 copies for personal use.
- Non-profit educational institutions making multiple photocopies of articles for classroom use; all such reproduction must utilize institutionally owned equipment for this purpose.

***Use of copyrighted material requires proper citation.***

### SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 11, 2008

This is a License Agreement between Claudia Quentmeier ("You") and Springer ("Springer"). Please note that you are liable to account for Value Added Tax (VAT). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

License Number	1985831265165
License date	Jul 11, 2008
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Photosynthesis Research
Licensed content title	A two-photon excitation study on the role of carotenoid dark states in the regulation of plant photosynthesis
Licensed content author	Axel Wehling
Licensed content date	Jan 9, 2007
Volume number	90
Issue number	2
Pages	101 - 110
Type of Use	Thesis / Dissertation
Details of use	Print
Requestor Type	Individual
Portion of the article	Figures
Title of your thesis / dissertation	Zweiphotonen-Spektroskopie an Wildtyp-Pflanzen und Mutanten von Arabidopsis thaliana
Expected completion date	Jan 2008
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

#### Introduction

The publisher for this copyrighted material is Springer Science + Business Media. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

#### Limited License

With reference to your request to reprint in your thesis material on which Springer Science and Business Media control the copyright, permission is granted, free of charge, for the use indicated in your enquiry. Licenses are for one-time use only with a maximum distribution equal to the number that you identified in the licensing process.

This License includes use in an electronic form, provided it is password protected or on the university's intranet, destined to microfilming by UMI and University repository. For any

other electronic use, please contact Springer at ([permissions.dordrecht@springer.com](mailto:permissions.dordrecht@springer.com) or [permissions.heidelberg@springer.com](mailto:permissions.heidelberg@springer.com))

The material can only be used for the purpose of defending your thesis, and with a maximum of 100 extra copies in paper.

Although Springer holds copyright to the material and is entitled to negotiate on rights, this license is only valid, provided permission is also obtained from the (co) author (address is given with the article/chapter) and provided it concerns original material which does not carry references to other sources (if material in question appears with credit to another source, authorization from that source is required as well). Permission free of charge on this occasion does not prejudice any rights we might have to charge for reproduction of our copyrighted material in the future.

#### Altering/Modifying Material: Not Permitted

However figures and illustrations may be altered minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of the author(s) and/or Springer Science + Business Media. (Please contact Springer at [permissions.dordrecht@springer.com](mailto:permissions.dordrecht@springer.com) or [permissions.heidelberg@springer.com](mailto:permissions.heidelberg@springer.com))

#### Reservation of Rights

Springer Science + Business Media reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

#### Copyright Notice:

Please include the following copyright citation referencing the publication in which the material was originally published. Where wording is within brackets, please include verbatim.

"With kind permission from Springer Science+Business Media: <book/journal title, chapter/article title, volume, year of publication, page, name(s) of author(s), figure number(s), and any original (first) copyright notice displayed with material>."

Warranties: Springer Science + Business Media makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

#### Indemnity

You hereby indemnify and agree to hold harmless Springer Science + Business Media and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

#### No Transfer of License

This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without Springer Science + Business Media's written permission.

#### No Amendment Except in Writing

This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of Springer Science + Business Media, by CCC on Springer Science + Business Media's behalf).

### Objection to Contrary Terms

Springer Science + Business Media hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and Springer Science + Business Media (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

### Jurisdiction

All disputes that may arise in connection with this present License, or the breach thereof, shall be settled exclusively by the country's law in which the work was originally published.

v1.2

**Permissions Letter**

**Ref #** 08-26770-revised

**DATE:** Tuesday, July 8, 2008. Updated by E. Sandler.

**TO:** Claudia Quentmeier  
TU Braunschweig, Inst. f. Phys. u. Theo. Chemie  
Hans-Sommer-Strasse 10  
Braunschweig, Lo 38106  
Germany

**FROM:** Elizabeth Sandler, Rights and Permissions

**RE:** Your request for permission dated 07/08/08 submission id 36816

Regarding your request, we are pleased to grant you non-exclusive, non-transferable permission to use the AAAS material identified below in your dissertation or thesis identified below, but limited to the formats identified below, and provided that you meet the conditions / requirements below. Such permission is for one time use and therefore does not include permission for future editions, revisions, additional printings, updates, ancillaries, other formats, translations, or promotional pieces, unless otherwise permitted below. This permission does not apply to figures / artwork that are credited to non-AAAS sources. This permission does not include the right to modify AAAS material.

The following credit line must be printed along with the AAAS material: "From [Insert Full Reference Citation]. Reprinted with permission from AAAS."

This permission covers the use of the AAAS material identified herein in the following format versions of your dissertation/thesis:

☒ print

☒ microform

☒ Digitized / electronic versions , provided the reprinted AAAS material remains in situ and is not made digitally available separated from your dissertation/thesis

AAAS agrees that ProQuest/UMI may supply copies of the dissertation/thesis on demand.

If the requested material is sourced to or references non-AAAS sources, you must obtain authorization from that source as well.

Permission fees are waived in this instance. AAAS reserves the right to charge for reproduction of AAAS controlled material in the future.

AAAS must publish the full paper prior to use of any text.

AAAS does not supply photos or artwork. Use of the AAAS material must not imply any endorsement by the American Association for the Advancement of Science. This permission is not valid for the use of the AAAS and/or SCIENCE logos.

**Permission is valid for use of the following AAAS material only:**

Fig 1C, Fig1D, Fig2, Fig4 from Nancy E. Holt et al., SCIENCE 307:433-436 (21 January 2005)

**In the following work only:**

ZWEIPHOTONEN-SPEKTROSKOPIE AN WILDTYP-PFLANZEN UND MUTANTEN VON  
/ARABIDOPSIS THALIANA/ October 2008

*Thank you for writing. If you have any questions please call me at (202) 326-6765 or write to me via fax at (202) 682-0816. For international calls, +1 is the country code for the United States.*

**Headquarters:**

**1200 New York Avenue, NW, Washington, D.C. 20005 USA**

Dear Dr. Quentmeier,

Permission is granted for your use of the figures as described in your message below. Please cite the full journal references and "Copyright (copyright year) National Academy of Sciences, U.S.A."

There is no fee for you to reuse the figures.

Best regards,

Ariana Raveica for  
Diane Sullenberger  
Executive Editor  
PNAS

---

**From:** Claudia[mailto:c.quentmeier@tu-bs.de]

**Sent:** Tuesday, July 08, 2008 7:11 AM

**To:** PNAS Permissions

**Subject:** Reprint request

Dear sir oder madam,

My name is Claudia Quentmeier, I´am a student of the Technische Universität Braunschweig, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, Hans- Sommer-Strasse 10, 38106 Braunschweig, Germany. My fone number is 0049-531-391-7378, fax: 0049-531-391-7385, e-mail: [c.quentmeier@tu-bs.de](mailto:c.quentmeier@tu-bs.de)

I am a PhD-student and I am writing my thesis/dissertation.

I would like to reprint 3 figures of the following article in my thesis.

PNAS, vol. 100, no.8, pages 4377-4382, April 15, 2003

Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting, Ying-Zhong Ma, Nancy E. Holt, Xiao-Ping Li, Krishna Niyogi and Graham R. Fleming. The Figures I would like to reprint are:

Figure 2, page 4379, Figure 3, page 4380, Figure 4, page 4380

The titel will be "Zweiphotonen-Spektroskopie an *Arabidopsis thaliana* und deren Mutanten. I am the author of this thesis, the numbers of the copies will be about 15 and it will be publishes by a publishing company. The work will be nonprofit.

I would like to know if it is free of charge to reprint these figures, otherwise I will not reprint these figures!

best whishes,

Claudia Quentmeier  
TU Braunschweig  
Inst. f. Phys. u. Theo. Chemie  
Hans-Sommer-Strasse 10  
38106 Braunschweig  
Germany  
Telefon: 0531-391-7378  
Fax: 0531-391-7385



Copyright (c) 2008 Claudia Quentmeier.

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.2 or any later version published by the Free Software Foundation; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts. A copy of the license is included in the section entitled "GNU Free Documentation License".

Commons:GNU Free Documentation License

From Wikimedia Commons, the free media repository

Version 1.2, November 2002

Copyright (C) 2000,2001,2002 Free Software Foundation, Inc.

51 Franklin St, Fifth Floor, Boston, MA 02110-1301 USA

Everyone is permitted to copy and distribute verbatim copies of this license document, but changing it is not allowed.

## 0. PREAMBLE

The purpose of this License is to make a manual, textbook, or other functional and useful document "free" in the sense of freedom: to assure everyone the effective freedom to copy and redistribute it, with or without modifying it, either commercially or noncommercially. Secondly, this License preserves for the author and publisher a way to get credit for their work, while not being considered responsible for modifications made by others.

This License is a kind of "copyleft", which means that derivative works of the document must themselves be free in the same sense. It complements the GNU General Public License, which is a copyleft license designed for free software.

We have designed this License in order to use it for manuals for free software, because free software needs free documentation: a free program should come with manuals providing the same freedoms that the software does. But this License is not limited to software manuals; it can be used for any textual work, regardless of subject matter or whether it is published as a printed book. We recommend this License principally for works whose purpose is instruction or reference.

## 1. APPLICABILITY AND DEFINITIONS

This License applies to any manual or other work, in any medium, that contains a notice placed by the copyright holder saying it can be distributed under the terms of this License. Such a notice grants a world-wide, royalty-free license, unlimited in duration, to use that work under the conditions stated herein. The "Document", below, refers to any such manual or work. Any member of the public is a licensee, and is addressed as "you". You accept the license if you copy, modify or distribute the work in a way requiring permission under copyright law.

A "Modified Version" of the Document means any work containing the Document or a portion of it, either copied verbatim, or with modifications and/or translated into another language.

A "Secondary Section" is a named appendix or a front-matter section of the Document that deals exclusively with the relationship of the publishers or authors of the Document to the Document's overall subject (or to related matters) and contains nothing that could fall directly within that overall subject. (Thus, if the Document is in part a textbook of mathematics, a Secondary Section may not explain any mathematics.) The relationship could be a matter of historical connection with the subject or with related matters, or of legal, commercial, philosophical, ethical or political position regarding them.

The "Invariant Sections" are certain Secondary Sections whose titles are designated, as being those of Invariant Sections, in the notice that says that the Document is released under this License. If a section does not fit the above definition of Secondary then it is not allowed to be designated as Invariant. The Document may contain zero Invariant Sections. If the Document does not identify any Invariant Sections then there are none.

The "Cover Texts" are certain short passages of text that are listed, as Front-Cover Texts or Back-Cover Texts, in the notice that says that the Document is released under this License. A Front-Cover Text may be at most 5 words, and a Back-Cover Text may be at most 25 words.

A "Transparent" copy of the Document means a machine-readable copy, represented in a format whose specification is available to the general public, that is suitable for revising the document straightforwardly with generic text editors or (for images composed of pixels) generic paint programs or (for drawings) some widely available drawing editor, and that is suitable for input to text formatters or for automatic translation to a variety of formats suitable for input to text formatters. A copy made in an otherwise Transparent file format whose markup, or absence of markup, has been arranged to thwart or discourage subsequent modification by readers is not Transparent. An image format is not Transparent if used for any substantial amount of text. A copy that is not "Transparent" is called "Opaque".

Examples of suitable formats for Transparent copies include plain ASCII without markup, Texinfo input format, LaTeX input format, SGML or XML using a publicly available DTD, and standard-conforming simple HTML, PostScript or PDF designed for human modification. Examples of transparent image formats include PNG, XCF and JPG. Opaque formats include proprietary formats that can be read and edited only by proprietary word processors, SGML or XML for which the DTD and/or processing tools are not generally available, and the machine-generated HTML, PostScript or PDF produced by some word processors for output purposes only.

The "Title Page" means, for a printed book, the title page itself, plus such following pages as are needed to hold, legibly, the material this License requires to appear in the title page. For works in formats which do not have any title page as such, "Title Page" means the text near the most prominent appearance of the work's title, preceding the beginning of the body of the text.

A section "Entitled XYZ" means a named subunit of the Document whose title either is precisely XYZ or contains XYZ in parentheses following text that translates XYZ in another language. (Here XYZ stands for a specific section name mentioned below, such as "Acknowledgements", "Dedications", "Endorsements", or "History".) To "Preserve the Title" of such a section when you modify the Document means that it remains a section "Entitled XYZ" according to this definition.

The Document may include Warranty Disclaimers next to the notice which states that this License applies to the Document. These Warranty Disclaimers are considered to be included by reference in this License, but only as regards disclaiming warranties: any other implication that these Warranty Disclaimers may have is void and has no effect on the meaning of this License.

## 2. VERBATIM COPYING

You may copy and distribute the Document in any medium, either commercially or noncommercially, provided that this License, the copyright notices, and the license notice saying this License applies to the Document are reproduced in all copies, and that you add no other conditions whatsoever to those of this License. You may not use technical measures to obstruct or control the reading or further copying of the copies you make or distribute.

However, you may accept compensation in exchange for copies. If you distribute a large enough number of copies you must also follow the conditions in section 3.

You may also lend copies, under the same conditions stated above, and you may publicly display copies.

### 3. COPYING IN QUANTITY

If you publish printed copies (or copies in media that commonly have printed covers) of the Document, numbering more than 100, and the Document's license notice requires Cover Texts, you must enclose the copies in covers that carry, clearly and legibly, all these Cover Texts: Front-Cover Texts on the front cover, and Back-Cover Texts on the back cover. Both covers must also clearly and legibly identify you as the publisher of these copies. The front cover must present the full title with all words of the title equally prominent and visible. You may add other material on the covers in addition. Copying with changes limited to the covers, as long as they preserve the title of the Document and satisfy these conditions, can be treated as verbatim copying in other respects.

If the required texts for either cover are too voluminous to fit legibly, you should put the first ones listed (as many as fit reasonably) on the actual cover, and continue the rest onto adjacent pages.

If you publish or distribute Opaque copies of the Document numbering more than 100, you must either include a machine-readable Transparent copy along with each Opaque copy, or state in or with each Opaque copy a computer-network location from which the general network-using public has access to download using public-standard network protocols a complete Transparent copy of the Document, free of added material. If you use the latter option, you must take reasonably prudent steps, when you begin distribution of Opaque copies in quantity, to ensure that this Transparent copy will remain thus accessible at the stated location until at least one year after the last time you distribute an Opaque copy (directly or through your agents or retailers) of that edition to the public.

It is requested, but not required, that you contact the authors of the Document well before redistributing any large number of copies, to give them a chance to provide you with an updated version of the Document.

### 4. MODIFICATIONS

You may copy and distribute a Modified Version of the Document under the conditions of sections 2 and 3 above, provided that you release the Modified Version under precisely this License, with the Modified Version filling the role of the Document, thus licensing distribution and modification of the Modified Version to whoever possesses a copy of it. In addition, you must do these things in the Modified Version:

**A.** Use in the Title Page (and on the covers, if any) a title distinct from that of the Document, and from those of previous versions (which should, if there were any, be listed in the History section of the Document). You may use the same title as a previous version if the original publisher of that version gives permission.

**B.** List on the Title Page, as authors, one or more persons or entities responsible for authorship of the modifications in the Modified Version, together with at least five of the principal authors of the Document (all of its principal authors, if it has fewer than five), unless they release you from this requirement.

**C.** State on the Title page the name of the publisher of the Modified Version, as the publisher.

**D.** Preserve all the copyright notices of the Document.

**E.** Add an appropriate copyright notice for your modifications adjacent to the other copyright notices.

**F.** Include, immediately after the copyright notices, a license notice giving the public permission to use the Modified Version under the terms of this License, in the form shown in the Addendum below.

**G.** Preserve in that license notice the full lists of Invariant Sections and required Cover Texts given in the Document's license notice.

**H.** Include an unaltered copy of this License.

**I.** Preserve the section Entitled "History", Preserve its Title, and add to it an item stating at least the title, year, new authors, and publisher of the Modified Version as given on the Title Page. If there is no section Entitled "History" in the Document, create one stating the title, year, authors, and publisher of the Document as given on its Title Page, then add an item describing the Modified Version as stated in the previous sentence.

**J.** Preserve the network location, if any, given in the Document for public access to a Transparent copy of the Document, and likewise the network locations given in the Document for previous versions it was based on. These may be placed in the "History" section. You may omit a network location for a work that was published at least four years before the Document itself, or if the original publisher of the version it refers to gives permission.

**K.** For any section Entitled "Acknowledgements" or "Dedications", Preserve the Title of the section, and preserve in the section all the substance and tone of each of the contributor acknowledgements and/or dedications given therein.

**L.** Preserve all the Invariant Sections of the Document, unaltered in their text and in their titles. Section numbers or the equivalent are not considered part of the section titles.

**M.** Delete any section Entitled "Endorsements". Such a section may not be included in the Modified Version.

**N.** Do not retitle any existing section to be Entitled "Endorsements" or to conflict in title with any Invariant Section.

**O.** Preserve any Warranty Disclaimers.

If the Modified Version includes new front-matter sections or appendices that qualify as Secondary Sections and contain no material copied from the Document, you may at your option designate some or all of these sections as invariant. To do this, add their titles to the list of Invariant Sections in the Modified Version's license notice. These titles must be distinct from any other section titles.

You may add a section Entitled "Endorsements", provided it contains nothing but endorsements of your Modified Version by various parties--for example, statements of peer review or that the text has been approved by an organization as the authoritative definition of a standard.

You may add a passage of up to five words as a Front-Cover Text, and a passage of up to 25 words as a Back-Cover Text, to the end of the list of Cover Texts in the Modified Version. Only one passage of Front-Cover Text and one of Back-Cover Text may be added by (or through arrangements made by) any one entity. If the Document already includes a cover text for the same cover, previously added by you or by arrangement made by the same entity you are acting on behalf of, you may not add another; but you may replace the old one, on explicit permission from the previous publisher that added the old one.

The author(s) and publisher(s) of the Document do not by this License give permission to use their names for publicity for or to assert or imply endorsement of any Modified Version.

## 5. COMBINING DOCUMENTS

You may combine the Document with other documents released under this License, under the terms defined in section 4 above for modified versions, provided that you include in the combination all of the Invariant Sections of all of the original documents, unmodified, and list

them all as Invariant Sections of your combined work in its license notice, and that you preserve all their Warranty Disclaimers.

The combined work need only contain one copy of this License, and multiple identical Invariant Sections may be replaced with a single copy. If there are multiple Invariant Sections with the same name but different contents, make the title of each such section unique by adding at the end of it, in parentheses, the name of the original author or publisher of that section if known, or else a unique number. Make the same adjustment to the section titles in the list of Invariant Sections in the license notice of the combined work.

In the combination, you must combine any sections Entitled "History" in the various original documents, forming one section Entitled "History"; likewise combine any sections Entitled "Acknowledgements", and any sections Entitled "Dedications". You must delete all sections Entitled "Endorsements."

#### 6. COLLECTIONS OF DOCUMENTS

You may make a collection consisting of the Document and other documents released under this License, and replace the individual copies of this License in the various documents with a single copy that is included in the collection, provided that you follow the rules of this License for verbatim copying of each of the documents in all other respects.

You may extract a single document from such a collection, and distribute it individually under this License, provided you insert a copy of this License into the extracted document, and follow this License in all other respects regarding verbatim copying of that document.

#### 7. AGGREGATION WITH INDEPENDENT WORKS

A compilation of the Document or its derivatives with other separate and independent documents or works, in or on a volume of a storage or distribution medium, is called an "aggregate" if the copyright resulting from the compilation is not used to limit the legal rights of the compilation's users beyond what the individual works permit. When the Document is included in an aggregate, this License does not apply to the other works in the aggregate which are not themselves derivative works of the Document.

If the Cover Text requirement of section 3 is applicable to these copies of the Document, then if the Document is less than one half of the entire aggregate, the Document's Cover Texts may be placed on covers that bracket the Document within the aggregate, or the electronic equivalent of covers if the Document is in electronic form. Otherwise they must appear on printed covers that bracket the whole aggregate.

#### 8. TRANSLATION

Translation is considered a kind of modification, so you may distribute translations of the Document under the terms of section 4. Replacing Invariant Sections with translations requires special permission from their copyright holders, but you may include translations of some or all Invariant Sections in addition to the original versions of these Invariant Sections. You may include a translation of this License, and all the license notices in the Document, and any Warranty Disclaimers, provided that you also include the original English version of this License and the original versions of those notices and disclaimers. In case of a disagreement between the translation and the original version of this License or a notice or disclaimer, the original version will prevail.

If a section in the Document is Entitled "Acknowledgements", "Dedications", or "History", the requirement (section 4) to Preserve its Title (section 1) will typically require changing the actual title.

### 9. TERMINATION

You may not copy, modify, sublicense, or distribute the Document except as expressly provided for under this License. Any other attempt to copy, modify, sublicense or distribute the Document is void, and will automatically terminate your rights under this License. However, parties who have received copies, or rights, from you under this License will not have their licenses terminated so long as such parties remain in full compliance.

### 10. FUTURE REVISIONS OF THIS LICENSE

The Free Software Foundation may publish new, revised versions of the GNU Free Documentation License from time to time. Such new versions will be similar in spirit to the present version, but may differ in detail to address new problems or concerns. See <http://www.gnu.org/copyleft/>.

Each version of the License is given a distinguishing version number. If the Document specifies that a particular numbered version of this License "or any later version" applies to it, you have the option of following the terms and conditions either of that specified version or of any later version that has been published (not as a draft) by the Free Software Foundation. If the Document does not specify a version number of this License, you may choose any version ever published (not as a draft) by the Free Software Foundation.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinem Doktorvater Prof. P. J. Walla danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die Förderung und Betreuung dieser Arbeit, die verbunden mit seiner ständigen Bereitschaft zur Diskussion zum guten Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. K. H. Gericke danke ich für die Übernahme des Korreferats sowie seinem Arbeitskreis für die Leihgabe diverser Optikbauteile.

Den Mitarbeitern der Werkstatt unter der Leitung von Herrn Peter Ahrens danke ich für die professionelle und schnelle Umsetzung meiner Wünsche.

Herrn Dr. Florian Bittner danke ich für die Nutzung der Wachstumskammern für die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und die fachlichen Diskussionen.

Den Mitgliedern unserer Braunschweiger Arbeitsgruppe, Axel Wehling, Stefan Bode und Pen-Nan Liao danke ich für die schönen Stunden und die Hilfe bei dieser Arbeit. Dem Göttinger Teil unserer Gruppe mit Hendrik Hippchen, Wiebke Pohl und Anna Cypionka danke ich für die netten Gespräche und Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben. Vorallem danke ich meinem Mann Stefan für den liebevollen Beistand, die anregenden Diskussionen und die Hilfe bei der Durchsicht dieser Arbeit.